

A. La fièvre de la vallée du Rift

1. Historique

A partir des années 1910, une maladie mortelle affectant les agneaux et causant des fièvres ainsi que des avortements chez les brebis gestantes a été rapportée dans des fermes situées dans la vallée du Rift au Kenya (Murithi et al., 2011). C'est en 1930, lors de l'investigation d'une épidémie similaire que l'équipe de R. Daubney et J.R. Hudson a identifié l'agent responsable de cette maladie (R. Daubney and J.R. Hudson, 1930). A cette période, d'autres maladies virales affectant les ovins ont été identifiées telles que la maladie du mouton de Nairobi (Nairobi sheep disease virus) et le virus de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue virus). Cependant les symptômes observés chez les moutons malades étaient différents de ceux causés par ces virus déjà connus. Afin d'établir une relation causale entre la maladie et l'agent pathogène, R. Daubney et J.R. Hudson ont injecté du sang prélevé dans des moutons malades à des moutons sains. Après l'inoculation, les moutons ont développé des symptômes identiques à ceux observés chez des moutons naturellement infectés. Ce pathogène extrait par filtration présente une taille inférieure à celui du virus de la fièvre aphteuse (Foot-and-mouth-disease). C'est ainsi que l'agent étiologique responsable de fièvre chez les moutons adultes, d'avortement de femelles gestantes et d'une mortalité élevée chez les agneaux a été identifié et a été nommé « virus de la fièvre de la vallée du Rift ».

2. La transmission

a) Les hôtes naturels

Le vFVR affecte principalement le bétail (bovins, ovins, caprins, camélidés) et les ruminants sauvages (impalas, gazelles, gnous) en Afrique (Pepin et al., 2010). Parmi les ruminants domestiques, les ovins sont les plus susceptibles au virus et les critères déterminant cette susceptibilité restent inconnus. Le rôle des rongeurs sauvages en tant qu'hôte n'a pas été confirmé à ce jour mais ils pourraient contribuer à la circulation du pathogène dans l'environnement (Olive et al., 2012; Rostal et al., 2017). L'Homme peut également être

infecté par le virus et représente l'hôte terminal (ou accidentel), c'est-à-dire qu'il ne participe pas au maintien du virus.

b) Les réservoirs

Par définition, un réservoir au sens épidémiologique est un être vivant qui assure la survie d'un agent pathogène et sa transmission à un autre organisme (adaptée du dictionnaire Larousse). Le rôle des moustiques dans la transmission de la maladie a été mis en évidence par l'équipe de Smithburn en 1948 dans la souris et le primate non humain (Smithburn et al., 1948). Bien que ce virus puisse infecter plusieurs arthropodes (tiques, mouches, phlébotomes), les moustiques sont les principaux réservoirs actifs du virus (Lumley et al., 2017). En effet, la compétence vectorielle est liée à la capacité du virus à surmonter plusieurs barrières anatomiques pour se répliquer, se maintenir dans le moustique et être ensuite transmis dans l'hôte (Figure 1). Classiquement, les virus transmissibles par les moustiques se répliquent dans les cellules épithéliales intestinales du moustique suite à la prise alimentaire (« midgut infection barrier »), se disséminent dans l'organisme (« midgut escape barrier »), atteignent les glandes salivaires (« salivary gland infection barrier ») et pour certains virus les ovaires. Les virus sont ensuite transmis dans l'hôte par piqûre (« salivary gland escape barrier ») (Franz et al. 2015). Les espèces compétentes pour véhiculer le vFVR appartiennent principalement à la famille des *Culicinae*, des genres *Aedes* et *Culex*. Alors que les moustiques *Aedes* sont impliqués dans le maintien du virus dans l'environnement par la transmission trans-ovarienne du pathogène, les moustiques *Culex* semblent jouer un rôle plus important dans le déclenchement d'une épidémie (Lumley et al., 2017).

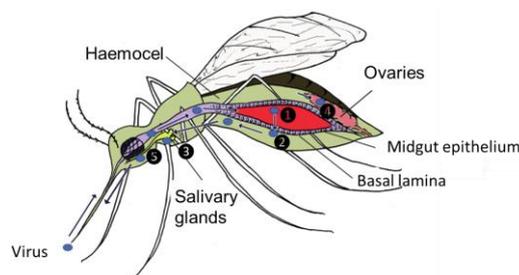


Figure 1 : Cycle d'infection d'un arbovirus chez le moustique

Après son entrée durant la prise alimentaire, le virus (représenté par un cercle bleu) doit se répliquer dans les cellules l'épithélium intestinal de l'hémocèle ou l'estomac (1); traverser l'épithélium intestinal (2) et se propager dans l'organisme; migrer vers les glandes salivaires (3) ou vers les ovaires (4) et s'y répliquer; infecter l'hôte lors d'une piqûre (5). *Adaptée Lumley et al., Journal of General Virology 2017;98:875–887.*

c) Cycles de transmission

i. Cycle enzootique

Les moustiques femelles du genre *Aedes* infectés sont associés à la persistance du virus dans l'environnement durant les périodes enzootiques. Ils peuvent transmettre le virus à leurs descendants par transmission trans-ovarienne (Lumley et al., 2017). Les œufs potentiellement infectés sont capables de résister à la dessiccation et de rester à l'état quiescent pendant de longues périodes. A la survenue des pluies, les œufs éclosent et les moustiques adultes infectés par le vFVR infectent les ruminants sauvages et/ou domestiques par piqûre créant ainsi des foyers d'infection locaux (Figure 2).

ii. Cycle épidémique

Lors des périodes d'inondations qui sont propices à l'éclosion des œufs infectés, un grand nombre de moustiques *Aedes* infectés par le vFVR initie alors la dissémination du virus par piqûre chez les ruminants sauvages et le bétail. Ces derniers sont à leur tour des hôtes pour d'autres moustiques compétents, notamment du genre *Culex* déclenchant ainsi des épidémies.

Chez les ruminants, l'infection a également lieu par contact du sang, des fœtus avortés et des tissus (membranes placentaires) provenant d'animaux infectés (Pepin et al., 2010). Une transmission verticale du pathogène a lieu chez les femelles gestantes (Antonis et al., 2013; Makoschey et al., 2016).

L'infection chez l'Homme s'effectue principalement par contact directe lors de la manipulation d'animaux ou de carcasses infectées. La consommation d'aliments provenant d'animaux infectés tels que le lait non pasteurisé est également un autre mode d'infection (Sissoko et al., 2009). Les infections par piqûres de moustiques sont possibles bien qu'elles soient difficiles à mettre en évidence. Aucune transmission horizontale (interhumaine) et verticale du virus chez l'Homme n'a été confirmée à ce jour.

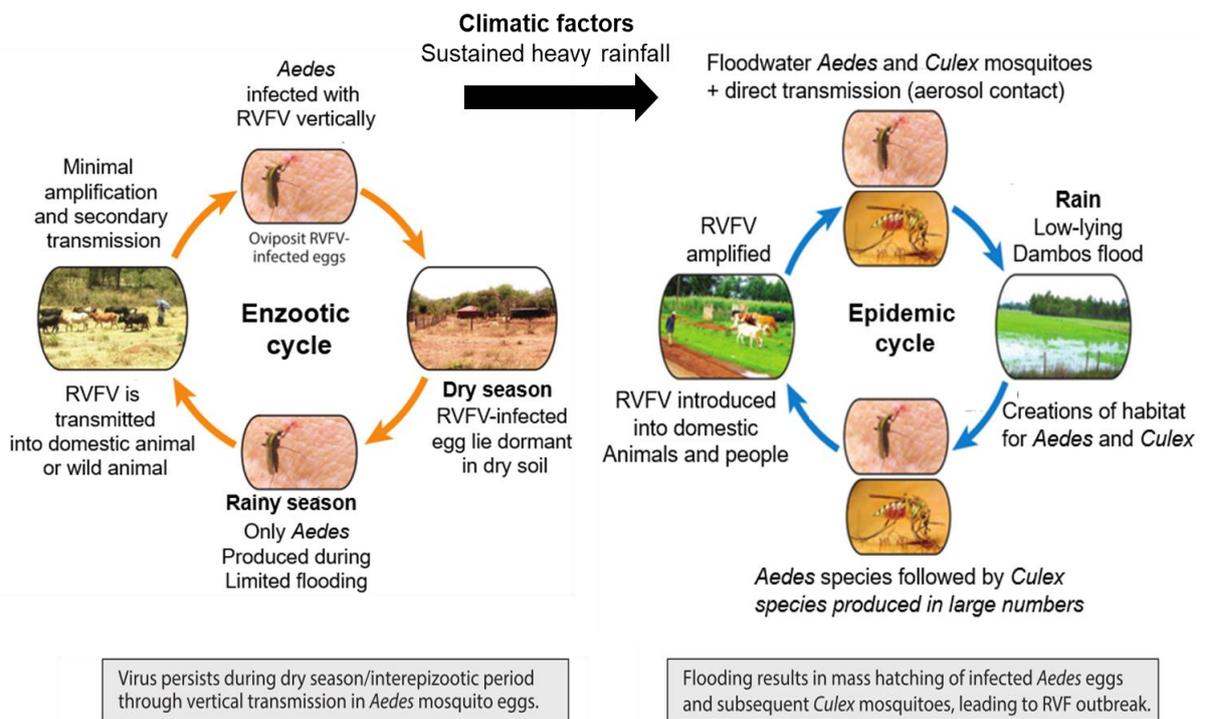


Figure 2: Les cycles de transmissions du virus de la fièvre de la vallée du Rift

Lors des périodes de précipitations normales, le virus se maintiendrait dans l’environnement par transmission verticale chez les moustiques du genre *Aedes*, créant ainsi des foyers d’infection locaux (cycle enzootique, gauche). Le passage d’une enzootie à une épidémie (cycle épidémique, droite) est fortement associé à des périodes de fortes précipitations qui sont favorables au développement de nombreux moustiques compétents des genres *Aedes* et *Culex*. Adaptée d’après, Linthicum et al., *Annu. Rev. Entomol.* 2016. 61:395–415.

3. La pathologie chez les hôtes naturels

a) Les Hommes

Après une infection par le vFVR, l’Homme peut développer des symptômes de sévérités différentes (Ikegami and Makino, 2011). Dans la grande majorité des cas, des formes bénignes avec rémission sont observées tandis que seulement 1 à 2% des patients infectés vont développer des formes graves (Nguku et al., 2010).

- Les formes bénignes:

La plupart des patients atteints de FVR développent un syndrome pseudo-grippal et la maladie est spontanément résolutive. Une période d'incubation variant de 4 à 6 jours est généralement observée. Les symptômes débutent avec des frissons, des vertiges, de l'asthénie, des maux de tête sévères et des nausées. Très rapidement les patients sont en hyperthermie et peuvent contracter des myalgies, des vomissements et des diarrhées. Dans certains cas, des complications ont été observées avec une récurrence des fièvres pouvant durer 10 jours puis les patients entrent en phase de convalescence.

-Les formes graves:

L'infection par le vFVR peut conduire à des infections oculaires avec une baisse de l'acuité visuelle qui peut perdurer plusieurs mois après la rémission. Dans de nombreux cas cette cécité partielle est définitive.

Des méningo-encéphalites avec des troubles neurologiques persistant pendant plusieurs mois ont été observés chez des patients infectés par le vFVR. Après une période de rémission (de l'ordre de semaines en mois) des fièvres, des céphalées, une perte de la vision, des difficultés dans les mouvements apparaissent et persistent pendant plusieurs semaines. Une infiltration de leucocytes dans le liquide céphalo-rachidien a été observée chez ces patients et témoigne d'une infection des méninges.

Des cas avec syndrome hémorragique ont été observés avec un taux de létalité élevé. Le début de l'infection se caractérise par de la fièvre, des ecchymoses, des vomissements, un ictère, des douleurs abdominales, des diarrhées avec une atteinte hépatique mise en évidence par l'élévation des transaminases dans le sang (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase et lactate déshydrogénase).

Un cas rare de thrombose fatale a été observé chez un patient infecté par le vFVR. Après une période de rémission, le patient a contracté des embolies pulmonaires à répétition et qui auraient entraîné le décès du patient.

Enfin, une étude a mis en évidence un nombre élevé de cas d'avortements chez des patientes soudanaises infectées par le vFVR (Baudin et al., 2016). Il reste cependant très difficile de confirmer le rôle du vFVR dans des avortements par transmission verticale chez les femmes infectées.

b) Les ruminants

Chez les moutons, les hôtes les plus susceptibles au vFVR, les symptômes révélateurs d'une infection par le vFVR sont caractérisés par des fièvres, une perte d'appétit, des avortements massifs (ou « abortion storm ») estimés à 40% au sein d'un cheptel (Barnard and Botha, 1977) et une létalité élevée proche de 100% chez les nouveau-nés (Ikegami and Makino, 2011). Les infections expérimentales ont permis de mieux comprendre la pathogénicité et ont montré des résultats similaires entre une infection naturelle et expérimentale. Des létalités de 20% et >90% ont été observées suite à une infection expérimentale par le vFVR, chez des moutons adultes et nouveau-nés respectivement (R. Daubney and J.R. Hudson, 1930). Des fièvres pouvant atteindre 42°C apparaissent entre 2 à 3 jours post-infection, avec une perte d'appétit, des diarrhées, des écoulements nasaux, des conjonctivites et des prostrations ont été observés chez des jeunes adultes (Busquets et al., 2010; Tomori and Schmitz, 1996). Des œdèmes pulmonaires, des nécroses hépatiques et des lésions cérébrales ont été observés chez des moutons expérimentalement infectés après analyses post mortem (Ikegami and Makino, 2011). Le vFVR est capable de traverser la barrière placentaire et d'induire une nécrose des cotylédons et des villosités chorionales causant des avortements (Antonis et al., 2013; Baskerville et al., 1992). L'infection entraîne soit la mortalité du fœtus, soit des malformations du nouveau-né (Makoschey et al., 2016).

Les chèvres sont également des hôtes du virus et développent des symptômes similaires à ceux observés chez les moutons infectés (fièvre, avortement, léthargie, mortalité chez les nouveau-nés) (Bird and Ksiazek, 2009). Un pic de fièvre a été mesuré à 2 jours après une infection expérimentale sur des chèvres de 4 mois par une souche sauvage ZH501 du vFVR (Nfon et al., 2012).

Les bovins infectés présentent des symptômes similaires (fièvre, avortement chez les femelles, léthargie, mortalité chez les nouveau-nés) mais sont moins susceptibles que les moutons (Bird and Ksiazek, 2009). La létalité est estimée entre 5% à 10% chez les adultes infectés par le vFVR alors qu'elle varie de 10 à 70% chez les nouveau-nés. Des analyses post-mortem de veaux ou vaches infectés lors d'une épidémie survenue en Afrique du Sud entre 1974 et 1975 ont montré des atteintes hépatiques (nécroses des cellules hépatiques) (Coetzer, 1982).

Chez les camélidés, deux formes cliniques ont été décrites lors d'une épidémie survenue en Mauritanie en 2010. L'infection par le vFVR peut conduire à une forme hyper-aiguë qui est caractérisée par une mort subite, et la forme aiguë qui est caractérisée par des fièvres, une ataxie, des œdèmes à la base du cou, des difficultés respiratoires, des ictères, des conjonctivites sévères qui entraînent une cécité, des hémorragies gingivales, des lésions au niveau des pieds et des avortements chez les chamelles (Ould El Mamy et al., 2011).

Les symptômes contractés par les ruminants sauvages ont été peu étudiés et n'ont pas été clairement définis à ce jour.

4. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Le vFVR est un virus enveloppé qui appartient à l'ordre des *Bunyavirales*, à la famille des *Phenuiviridae* et au genre *Phlebovirus* (classement ICTV 2016).

a) Structure du virion

Les virions sont de forme sphérique et ont une taille qui varie de 90 à 110 nm de diamètre. A leur surface, l'enveloppe est recouverte par deux glycoprotéines, Gn et Gc qui forment des capsomères disposés selon une symétrie icosaédrique (Freiberg et al., 2008). A l'intérieur, les virions renferment 3 segments d'ARN recouverts par la protéine N et chaque segment est associé à une polymérase virale ARN-dépendant (ou RdRp, « RNA-dependent RNA polymerase ») formant ainsi la ribonucléocapside (RNP) (Figure 3).

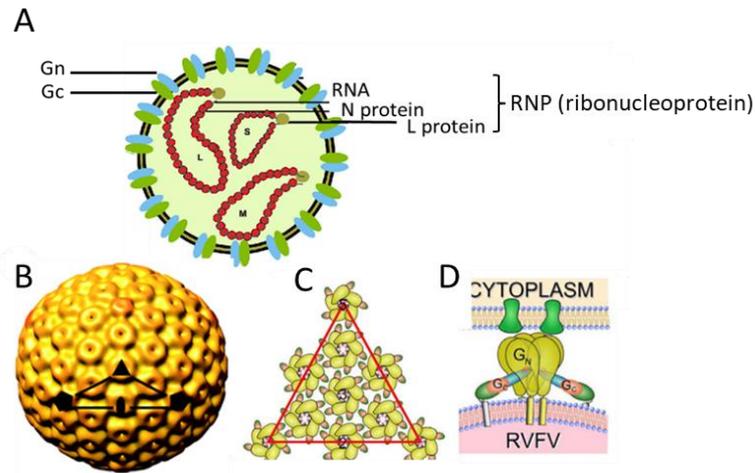


Figure 3: Structure du virus de la fièvre de la vallée du Rift

A. Le virion contient à sa surface deux glycoprotéines (Gn et Gc) ancrées dans la membrane. Les trois segments d'ARN (S, M et L) sont recouverts de nombreuses copies de la protéine N. Chaque brin d'ARN est associé à une polymérase virale ARN-dépendante.

B. Modélisation de la structure tridimensionnelle du virion. Une triangulation est indiquée en noir (B) et est représentée schématiquement en C.

D. Représentation schématisée de l'interaction entre le vFVR et la cellule hôte. La protéine d'attachement Gn se lie à un récepteur de la cellule hôte (vert).

Adaptée d'après Natasha L. Tilson-Lunel et al., Viruses, 2017, 9, 220 ; Alexander N. Freiberg et al., Journal of Virology, Nov. 2008, p. 10341–10348 et Mirabela Rusu et al., Front Microbiol. 2012 Jul 19;3:254.

b) Description du génome viral

Le vFVR possède un génome à ARN simple brin négatif tri-segmenté (Figure 4). Les segments S (« small »), M (« medium ») et L (« large »), nommés en fonction de leur taille, mesurent respectivement 1.7 kb, 3.8 kb et 6.4 kb (Pepin et al., 2010). Le segment S est ambisens et possède 2 cadres de lecture. La nucléoprotéine N est synthétisée dans le sens génomique tandis que la protéine NSs en anti-génomique. Le segment M code des protéines non structurales (NSm) et structurales (Gn/Gc). Il possède 5 cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels. Tandis que la protéine NSm (ou NSm2) est synthétisée à partir d'une polyprotéine codée par l'ORF 2, et sa forme tronquée (ou NSm') à partir de l'ORF 3, la protéine Gn peut être synthétisée à partir d'une polyprotéine codée par toutes les ORFs, hormis l'ORF 1. Ce dernier code une polyprotéine nommée « 78 kDa-Gc » qui, après clivage aboutit à la formation d'une protéine 78 kDa (ou NSm1) et Gc (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014). L'ORF 2 code une polyprotéine qui sera clivée par des protéases cellulaires aboutissant à la formation des protéines NSm, Gn et Gc (Gerrard and Nichol, 2007). Des mutagenèses

dirigées dans les séquences codant les cadres de lecture 1 et 2 du segment M ont mis en évidence l'expression de la protéine Gn à partir des ORFs 3, 4 et 5 (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014; Phoenix et al., 2016a). Deux peptides signaux sont localisés dans les ORFs 1 et 4 permettent l'adressage des protéines NSm1 et Gn dans le réticulum endoplasmique (Pepin et al., 2010). Enfin, le segment L code l'ARN polymérase virale.

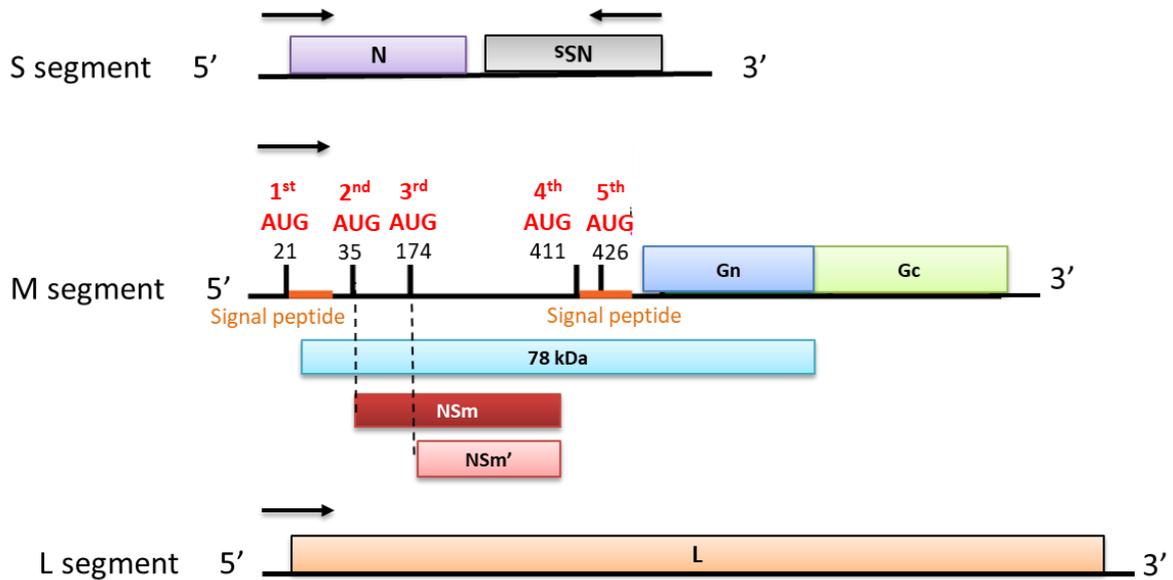


Figure 4: Représentation schématique du génome viral

Les 3 segments du génome viral ainsi que les protéines codées par chaque segment sont représentés. Les 5 cadres de lectures sont indiqués sur le segment M. Les peptides signaux (orange), les codons d'initiation (rouge) et leurs positions dans la séquence du segment M sont indiqués. Les flèches indiquent le sens l'orientation des phases ouvertes de lectures. D'après Kaori Terasaki et al., *J Innate Immun* 2015;7:450–458 et Inaia Phoenix et al., *Viruses* 2016, 8, 151.

c) Les rôles des protéines virales

Protéine N

L'encapsulation du génome viral par la nucléoprotéine N le protège contre les dégradations par des nucléases (Osborne and Elliott, 2000). Cette protéine est l'antigène majeur du vFVR.

Protéines Gn et Gc

Les glycoprotéines de surface Gn et Gc jouent un rôle essentiel dans l'infection des cellules hôtes. La protéine Gn est impliquée dans l'attachement à la cellule (Besselaar and Blackburn, 1992; Ikegami, 2012). La protéine Gc est impliquée dans la fusion des membranes virales et cellulaires. Lors de l'endocytose du virus dans la cellule hôte, un changement conformationnel s'opère par le biais du pH acide et catalyse la fusion des membranes (de Boer et al., 2012; Filone et al., 2006; Liu et al., 2008). Exposées à la surface, ces glycoprotéines induisent la production d'anticorps neutralisants essentiels pour la protection (Faburay et al., 2016) et sont des candidates privilégiées pour des stratégies vaccinales contre le vFVR.

Protéine NSs

La protéine NSs est un facteur de virulence majeur. En effet, une diminution de la mortalité a été observée dans des souris déficientes pour le récepteur IFN de type I (IFNAR^{-/-}) après l'infection par le clone 13, une souche atténuée du vFVR qui présente une délétion de 549 nucléotides dans le gène codant la NSs (Bouloy et al., 2001). Les protéines NSs s'agrègent entre elles pour former des filaments dans le noyau des cellules infectées et modulent ainsi l'expression des gènes de l'hôte (Ly and Ikegami, 2016). NSs est impliquée dans l'inhibition de la réponse antivirale de l'hôte. Elle réprime la transcription générale dans la cellule infectée, incluant l'expression des facteurs impliqués dans la réponse IFN de type I (IFN- α , β). La protéine NSs est capable de séquestrer la sous-unité p44 et promeut la dégradation de p62, composante importante du complexe de pré-initiation de la transcription, TFIID. NSs promeut également la dégradation de la protéine kinase ARN-dépendante (PKR) impliquée dans la défense cellulaire antivirale.

Protéines NSm1, NSm, NSm'

Le rôle des protéines non structurales NSm1, NSm et NSm' codées par le segment M n'a pas été complètement élucidé. Les protéines NSm et NSm' semblent avoir des propriétés anti-apoptotiques. La complémentation de la souche atténuée MP-12 du vFVR déficiente pour les protéines non structurales (NSm1, NSm et NSm') du segment M par un plasmide qui code pour les protéines NSm et NSm' induit la diminution de l'activité des caspases (Won et al., 2007). Ces protéines ne seraient pas essentielles pour l'infection dans les cellules de mammifères puisque l'infection de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain (Vero E6) par une souche recombinante MP-12 déficiente pour la région codant NSm1, NSm et

NSm' n'affecte pas la réplication du virus (Won et al., 2007). Les protéines NSm et NSm' semblent être des facteurs de virulence contrairement à la protéine NSm1 (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014). L'infection par une souche sauvage ZH548 du vFVR déficiente pour la synthèse de la protéine NSm1 chez des souris n'a aucun effet sur la virulence par rapport à la souche sauvage. La mutagenèse dirigée pour les ORFs codant seulement NSm ou NSm' n'a pas d'impact sur la virulence du virus après infection. En revanche, lorsque les ORFs permettant la synthèse de ces deux protéines sont mutés, la mortalité est fortement diminuée. La protéine NSm1 serait essentielle pour l'infection du virus dans les vecteurs. En effet, l'infection par la souche sauvage ZH548 déficiente pour la protéine NSm1 diminue l'infection et empêche sa dissémination dans les moustiques (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014).

d) Le cycle de réplication

La réplication virale des virus appartenant à l'ordre des *Bunyavirales* s'effectue dans le cytoplasme de la cellule hôte (Pepin et al., 2010) (Figure 6). Après l'attachement du virus à la cellule hôte, via la protéine Gn, et son endocytose, la protéine de fusion Gc change de conformation dans les endosomes sous l'influence du pH acide et induit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La ribonucléocapside est ainsi libérée dans le cytoplasme et subit une décapsidation.

Chaque segment d'ARN génomique viral est alors transcrit en ARNm par capture de coiffe d'ARNm cellulaire (« cap-snatching ») et sert de matrice pour la synthèse de brin d'ARN complémentaire (ARNc) (Pepin et al., 2010). Ce dernier sert à la fois pour la réplication de l'ARN viral génomique et la transcription d'ARNm codant la protéine NSs à partir du segment S ambisens.

Après traduction des ARNm par les ribosomes de la cellule hôte, les protéines N synthétisées dans le cytoplasme se lient spécifiquement aux segments des ARN viraux génomiques et aux ARNc. Le mécanisme impliqué dans la distinction entre les ARNm cellulaires et les ARN viraux génomiques ou complémentaires n'a pas été élucidé pour le vFVR. Cependant, pour d'autres virus de l'ordre des *Bunyavirales*, les Orthohantavirus, les protéines N reconnaissent spécifiquement une structure secondaire en manche (ou « panhandle ») dans les régions non codantes en 5' et 3' (Mir and Panganiban, 2005).

La traduction des ARNm viraux du segment M en polyprotéine a lieu dans les ribosomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines Gn et Gc obtenues par clivage via des protéases cellulaires (Figure 5) s'associent en hétérodimère dans la lumière du RE et sont ensuite adressées vers l'appareil de Golgi grâce à un signal d'adressage présent au niveau de la queue cytoplasmique de la protéine Gn pour subir des modifications post-traductionnelles (Gerrard and Nichol, 2002) de type N-glycosylation (Phoenix et al., 2016b).

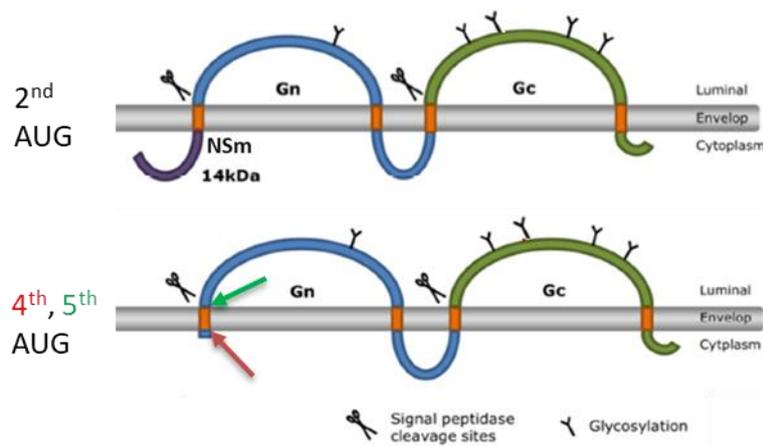


Figure 5: Polyprotéines NSm-Gn-Gc et Gn-Gc

Représentation schématique des polyprotéines générées à partir du codon d'initiation 2, 4 et 5. Les protéines NSm (violet), Gn (bleu) et Gc (vert) sont générés lors du clivage des précurseurs de polyprotéines. Les domaines transmembranaires (rectangles orange), les sites de clivages (ciseaux) par des protéases et les sites de glycosylations (« Y ») sont indiqués. D'après Steffen Matthijn de Boer (2013). "General introduction" (chap. 1), dans *Rift valley virus glycoproteins, key to entry and control* », Pays-Bas: Proefschriftmaken.nl. p 21.

Les glycoprotéines virales s'accumulent dans les membranes des saccules golgiens et l'interaction des RNP avec les glycoprotéines Gc déclenche l'assemblage des virions à la membrane de l'appareil de Golgi (Pepin et al., 2010). Des particules détectives ou infectieuses bourgeonnent à travers le réseau trans-golgien et sont ensuite transportées vers le milieu extracellulaire via des vésicules d'exocytoses (Wichgers Schreur and Kortekaas, 2016).

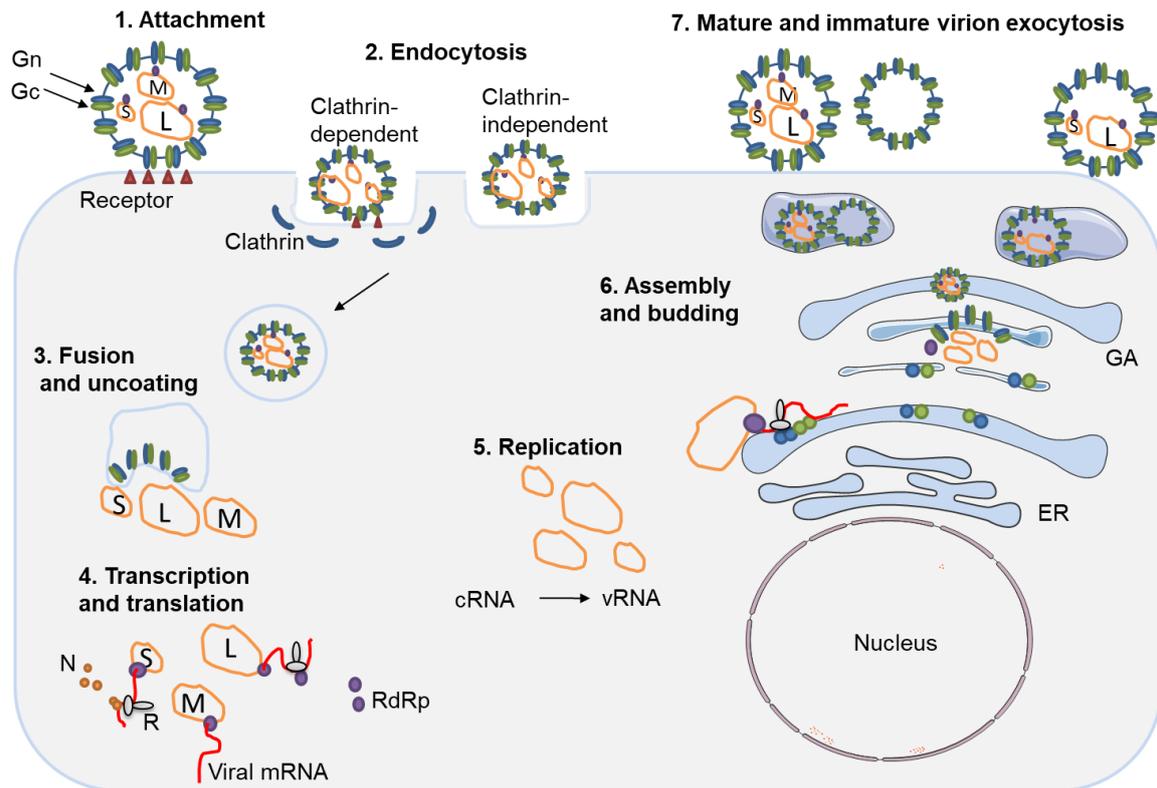


Figure 6: Représentation schématique du cycle de réplication

Après l'attachement du virus à la cellule hôte (1), les particules virales sont internalisées par un mécanisme clathrine-dépendant ou -indépendant (2). Sous l'acidification du pH, la protéine Gc change de conformation entraînant la fusion des membranes et la libération du génome viral suite à la décapsidation (3). Les segments L et S sont transcrits en ARNm et traduits (4) par les ribosomes (R) dans le cytoplasme aboutissant à la formation respectivement à l'ARN polymérase virale ARN-dépendante (RdRp) et la nucléoprotéine (N). Le segment M est transcrit en ARNm et la traduction aboutit à la formation de la polyprotéine dans le réticulum endoplasmique (ER). Les protéines Gn et Gc obtenues après clivage par des protéases sont adressées vers l'appareil de Golgi (GA). Suite à la réplication des segments d'ARN viraux génomiques (5), l'assemblage et le bourgeonnement des virions s'effectuent au niveau de l'appareil de Golgi (6). Les virions immatures et matures sont relargués dans le milieu extracellulaire par exocytose (7). *Adaptée de Paul J. Wichgers Schreur et al., PLoS Pathog 12(8): e1005800.*

e) Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'attachement

Les récepteurs de type C-lectine DC-SIGN et L-SIGN ainsi que l'héparane sulfate semble être impliqués dans l'attachement. Le récepteur DC-SIGN, exprimé sur les DCs dermiques ainsi que sur les macrophages, possède un domaine de reconnaissance de motifs glucidiques (« carbohydrate domain recognition ») et est donc un candidat potentiel pour la reconnaissance des protéines virales hautement glycosylées du vFVR. Pour montrer son implication dans l'attachement, des cellules cancéreuses d'origine humaine (HeLa) et des cellules dérivées d'un lymphome de Burkitt (Raji) surexprimant le récepteur DC-SIGN ont été infectées par le vFVR. Le pourcentage de cellules infectées était drastiquement augmenté dans ces cellules et l'infection était significativement diminuée en présence d'un anticorps anti-DC-SIGN (Lozach et al., 2011). Le rôle du récepteur L-SIGN a été mis en évidence de façon similaire. Exprimé sur les cellules endothéliales et les hépatocytes, il partage 77% d'homologie au niveau de sa séquence en acides aminés avec celle du récepteur DC-SIGN (Léger et al., 2016). Le pourcentage de cellules infectées était augmenté dans ces cellules Raji surexprimant L-SIGN (Léger et al., 2016). L'héparane sulfate, un polysaccharide présent à la surface des cellules contribuerait aussi à l'infection dans les cellules hôtes. L'infection de cellules d'ovaires d'hamster de Chine (CHO) par le vFVR était abolie lorsque ces dernières sont rendues déficientes en héparanes sulfates par traitement enzymatique (Boer et al., 2012).

f) La diversité génétique vFVR

A ce jour, il existe 416 souches du vFVR selon la banque de données Virp (« Virus Pathogen Resource ») et qui sont regroupées en un seul sérotype. En général, les virus à ARN possèdent une ARN polymérase peu fidèle par rapport aux virus à ADN (Sanjua, 2016). Cependant les analyses phylogénétiques du vFVR ont montré une bonne conservation du génome viral. L'alignement des différents segments de 33 souches sauvages du vFVR isolées à partir de patients ou de ruminants infectés en Afrique et en Arabie Saoudite lors des épidémies survenues entre 1944 et 2000 a montré une faible divergence entre les segments S, M et L de 4%, 5% et 4% respectivement au niveau des séquences nucléotidiques et de 1%, 2% et 1% respectivement au niveau des séquences en acides aminés (Bird et al., 2007). Le mécanisme par lequel cet arbovirus maintient une stabilité de son génome au cours de l'évolution reste à élucider. Une étude a montré l'apparition de mutations et délétions dans le génome viral

(gène codant NSs) du vFVR après des passages successifs dans des cellules d'insectes ou de mammifères, contrairement à des passages successifs alternés entre les deux types de cellules (Moutailler et al., 2011). Ces résultats soulèvent des questions sur la pertinence des modèles *in vitro*, la représentativité du nombre de passages par rapport à une situation écologique et restent à être confirmés dans des modèles *in vivo*. Ils suggèrent que le vFVR doit se maintenir à bas bruit par infection entre les moustiques, les rongeurs et les ruminants sauvages. Des questions sur l'adaptation du vFVR face à la pression évolutive pour cet arbovirus restent en suspens.

Des réassortiments possibles entre différentes souches ont été mis en évidence à travers différentes analyses phylogénétiques. Une analyse réalisée à partir d'une portion du segment M issue de 203 souches sauvages a montré 15 lignées distinctes (Figure 7) (Grobbelaar et al., 2011). Cette analyse a également mis en évidence des réassortiments possibles entre une souche vaccinale et sauvage. L'alignement des séquences du génome viral d'une souche isolée (SA184/10, lignée K) chez un patient accidentellement infecté lors d'une immunisation par le vaccin atténué Smithburn (lignée K) a montré une similitude entre les séquences nucléotidiques entre une portion du segment M de la souche vaccinale et une portion des segments S et L de la souche sauvage SA54/10 (lignée H) (Grobbelaar et al., 2011). D'autres études ont mis en évidence des réassortiments possibles en alignant des séquences NSs, Gn et L entre 18 souches sauvages (Sall et al., 1999). L'établissement d'arbres phylogénétiques a montré le regroupement des souches en 2 clusters majoritaires nommés I (Ia et Ib) et II. Le cluster I regroupe des souches isolées en Afrique Sub-Saharienne et le II regroupe des souches isolées dans d'autres régions (Egypte, Madagascar). La distribution des souches dans un cluster est similaire entre ces différents alignements. Pour certaines d'entre elles, les analyses ont montré un groupement dans un cluster différent selon les gènes comparés, suggérant des réassortiments de segments possibles entre elles.

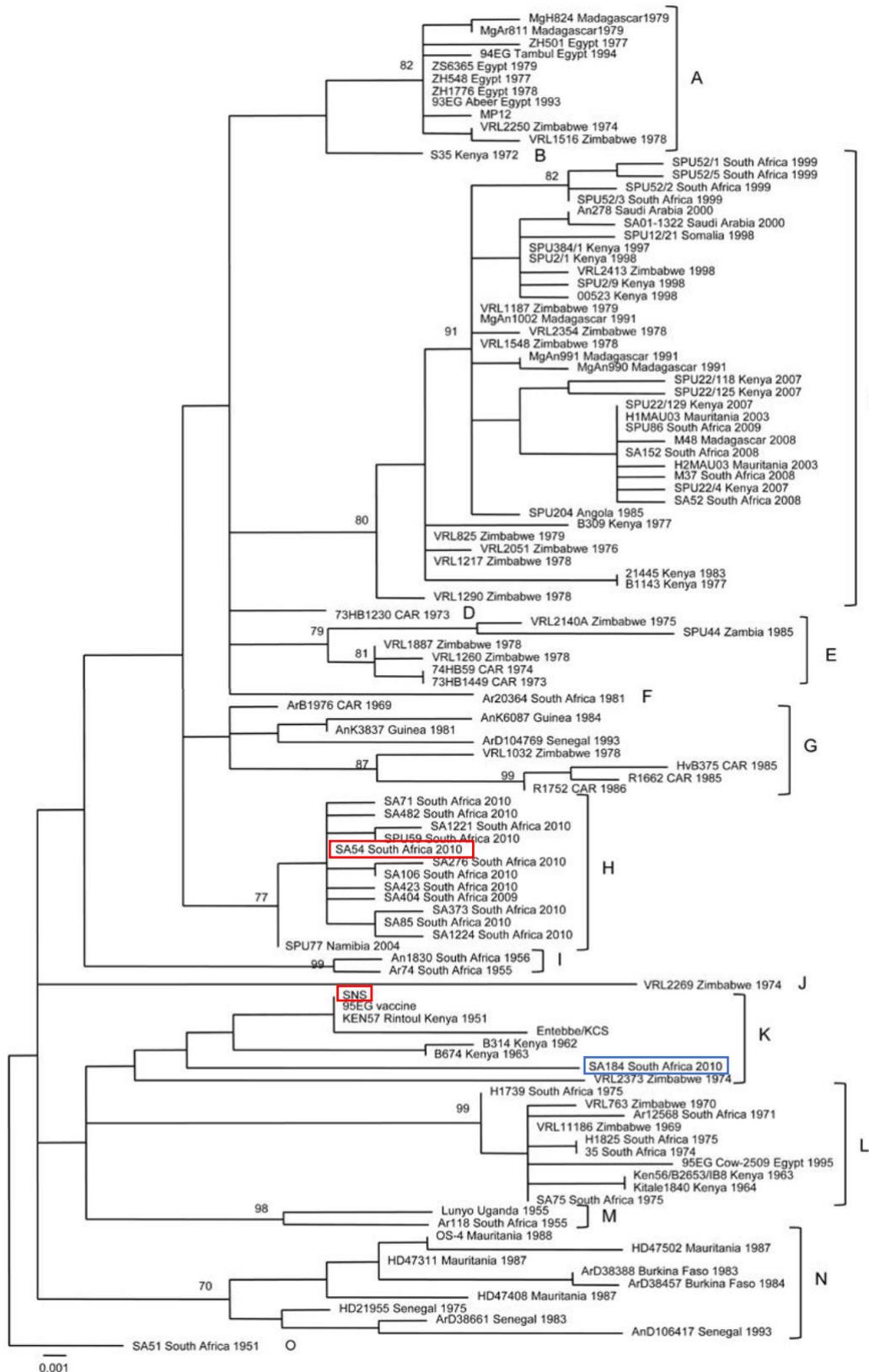


Figure 7: Arbre phylogénétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift

Les lignées génétiques (A à O) de 111 isolats du vRVF, basées sur une portion du gène codant Gn (490-nt). Les noms, pays d'origine et date d'isolement sont indiqués. Les souches Smithburn (SNS), SA54 (rouge) et la souche réassortie SA184 (bleu) sont encadrées. L'échelle indique le pourcentage de substitutions par site. D'après Grobelaar et al., *Emerging Infectious Diseases Vol. 17, No. 12, December 2011*.

5. Epidémiologie

Depuis sa caractérisation au Kenya en 1930, le vFVR s'est propagé dans les pays de l'Afrique du Sud-Est (Zimbabwe, Tanzanie, Namibie et Zambie) jusqu'en Afrique du Sud puis dans l'ensemble du continent africain jusqu'en Afrique du Nord (Mauritanie, Sénégal et Egypte) et en dehors du continent africain, au Moyen-Orient (Yémen, Arabie Saoudite). Il s'est également introduit dans certaines îles de l'océan Indien (Comores, Madagascar et Mayotte) (Nanyingi et al., 2015). Cette distribution géographique du pathogène serait liée aux échanges commerciaux intracontinentaux de bétails et à la circulation des espèces de moustiques compétentes. La fièvre de la vallée du Rift est maintenant considérée comme une zoonose endémique en Afrique avec une occurrence tous les 5 à 10 ans liée à la survenue de fortes précipitations conduisant à l'éclosion en masse de moustiques. Les épidémies occasionnent des pertes économiques importantes estimées de l'ordre du million de dollars (Nanyingi et al., 2015). Bien que la distinction n'ait pas été faite entre la mortalité chez des animaux infectés et abattus, les épidémies les plus graves ont été enregistrées en Afrique du Sud en 1951 avec des pertes estimées à 100 000 moutons et 500 000 avortements, au Kenya entre 2006-2007 avec 375 décès humains, en Egypte entre 1977-1978 avec 600 décès humains. Les épidémies étaient confinées au continent africain jusque dans les années 2000 puis des épidémies ont été rapportées en Arabie Saoudite et au Yémen avec plus de 300 décès humains et des pertes estimées à 7000 têtes de bétail. L'introduction du vFVR dans d'autres continents et la présence de patients et/ou de ruminants séropositifs pour le vFVR dans certains pays non-endémiques du Maghreb (Tunisie (Ayari-Fakhfakh et al., 2011), Maroc (Shari et al., 2011)) suscitent des inquiétudes sur une potentielle introduction dans les pays du bassin méditerranéen de l'Europe, où se trouvent des moustiques du genre *Aedes* et *Culex* compétents pour la propagation du virus (Moutailler et al., 2008). En effet, bien que le risque d'introduction en Europe soit faible par l'interdiction réglementaire d'importation de bétail provenant des pays endémiques, les échanges illégaux de bétail infecté vers l'Europe ne peuvent pas être exclus (Chevalier et al., 2010).

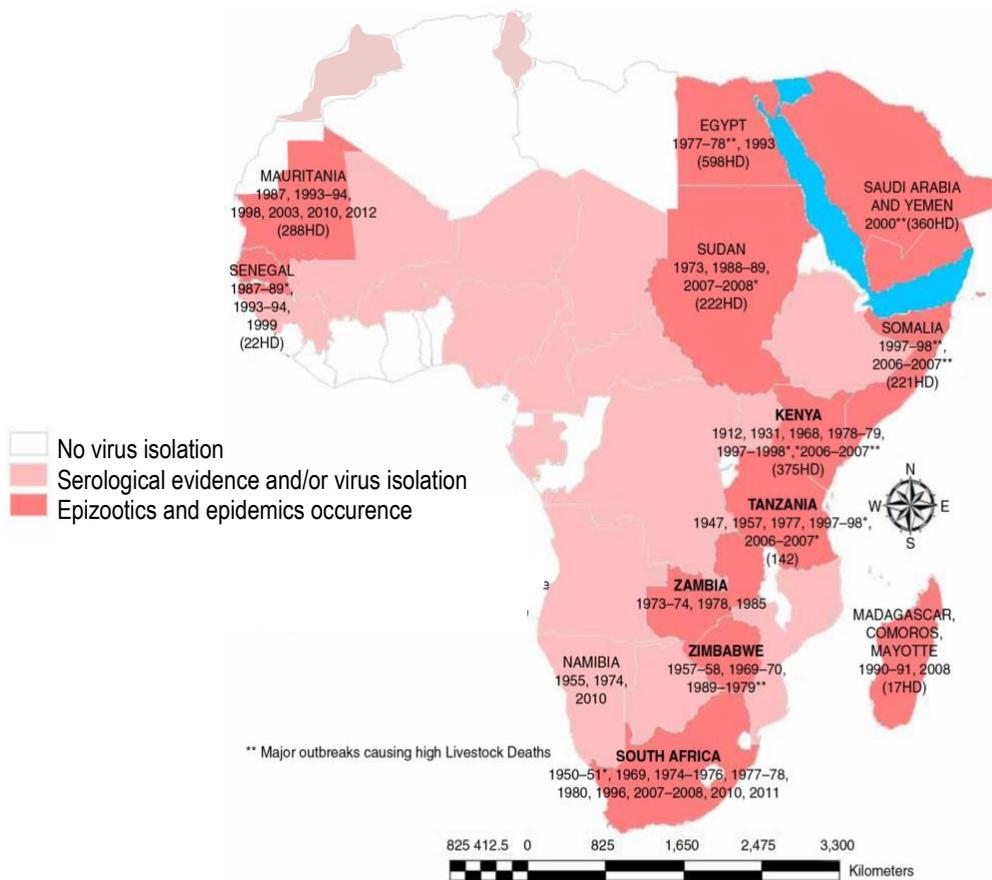


Figure 8 : Situation épidémiologique de la fièvre de la vallée du Rift (1994-2014)

Carte de l'Afrique et de la péninsule arabique illustrant la distribution spatiale et temporelle de la fièvre vallée du Rift depuis les premiers cas suspects en 1912 jusqu'en 2014. Le nombre total de décès humains (HD) est indiqué durant les épidémies. D'après Nanyingi et al., Infection Ecology and Epidemiology 2015, 5: 28024

B. Les stratégies vaccinales contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Pour prévenir l'infection par le vFVR, des vaccins à usage vétérinaire et pour l'Homme ont été développés. Seuls les vaccins à usage vétérinaire sont commercialisés dans les pays endémiques à l'heure actuelle. Dans les pays non-endémiques, aucun vaccin n'est disponible. Nous verrons dans cette partie les différents types de vaccins utilisés en zone endémique, leur efficacité et les nouvelles stratégies vaccinales développées contre le vFVR qui pourraient être à la fois utilisées en zones endémiques et non endémiques.

1. Les vaccins contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

a) Les vaccins conventionnels

i. Les virus inactivés

Les vaccins inactivés sont produits à partir d'agent pathogène rendu inactif ou « tué » par traitement thermique ou chimique. Les vaccins inactivés à la formaline ont été les tout premiers développés contre le vFVR (Faburay et al., 2017; Ikegami, 2017).

Deux vaccins ont ainsi été développés et testés chez l'Homme mais n'ont pas été commercialisés. Ils ont été utilisés pour protéger les professionnels (principalement les personnels de laboratoire et les militaires) qui étaient exposés au vFVR en Afrique. Le premier vaccin, appelé NDBR 103, a été produit à partir de la souche sauvage Entebbe du vFVR isolée chez le moustique en Ouganda. Dans un premier temps, le virus a été atténué par 184 passages par voie intrapéritonéale ou intraveineuse chez la souris, puis amplifié en cellules Vero. Il a ensuite été inactivé à la formaline pour obtenir le vaccin. Des vaccinations ont été réalisées chez 963 militaires et ont montré l'induction d'une réponse humorale neutralisante à long terme après 3 injections sous-cutanées. L'innocuité de ce vaccin semblait satisfaisante mais un des sujets a développé un syndrome de Guillain-Barré (Niklasson, 1982; Niklasson et al., 1985). Un autre vaccin appelé TSI GSD 200 à partir de la même souche mais avec deux passages supplémentaires dans des fibroblastes pulmonaires de singe (FRhL-2) (Ikegami and Makino, 2010). Un essai a été réalisé chez l'Homme et a montré des résultats similaires. Après 3 injections sous-cutanées, le vaccin a induit des anticorps neutralisants à long terme et aucun effet secondaire grave n'a été observé (Rusnak et al., 2011).

En revanche à ce jour, il existe trois vaccins inactivés commercialisés à usage vétérinaire. Ils ont été produits à partir de :

- La souche sauvage ZH501 isolée chez un patient durant l'épidémie de 1977 en Egypte et amplifiée en cellules rénales de hamster (BHK-21) puis inactivée à la formaline (Veterinary Serum and Vaccine Research Institute) (Botros et al., 2006).
- La souche sauvage Menya/sheep/258 isolée chez un mouton infecté, inactivée à la formaline (VACSERA) (Ahmed Kamal and Kamal, 2011).
- Une souche sauvage isolée chez une vache infectée, atténuée après 6 passages par voie intracérébrale chez la souris puis amplifiée en BHK-21 et inactivée à la formaline (Onderstepoort Biological Products) (Barnard and Botha, 1977).

Des études ont montré que les vaccins inactivés étaient capables d'induire des anticorps neutralisants chez les ruminants sans entraîner des effets secondaires (Lagerqvist et al., 2012). Toutefois ces vaccins inactivés n'ont pas conféré une immunité stérilisante et ne protégeait pas contre les avortements. Après 3 immunisations avec le vaccin inactivé chez des brebis gestantes, des avortements ont été observés durant une épidémie. Malgré la présence d'anticorps neutralisants circulants induits par le vaccin, une virémie a été mesurée et pourrait entraîner l'infection des tissus placentaires conduisant à des avortements (Barnard and Botha, 1977). De plus, plusieurs immunisations sont nécessaires pour conférer une bonne protection et ils présentent un coût élevé pour les éleveurs aux ressources limitées.

i. Les virus atténués

Des vaccins atténués ont été créés pour conférer une réponse immunitaire protectrice en une seule injection. Le pathogène dit « atténué » est capable de se répliquer et possèdent une virulence diminuée suite à des passages successifs dans des cellules *in vitro*, dans des œufs embryonnaires de poulet ou chez la souris.

Le vaccin atténué Smithburn a été le premier développé et utilisé en Egypte, en Arabie Saoudite, au Kenya, Zimbabwe et en Namibie (Faburay et al., 2017). Cette souche a été isolée à partir d'un pool de moustiques en Ouganda en 1944, amplifiée dans des embryons de poulet puis atténuée par passages successifs soit dans des souris par injection intracérébrale et embryons de poulet, soit dans des souris par injection intracérébrale et dans des cellules BHK-

21. Bien qu'il a montré une protection avec une seule immunisation chez des ruminants adultes (Warimwe et al., 2016), il a entraîné des avortements chez les vaches gestantes (Botros et al., 2006). Son utilisation serait également associée à un réassortiment possible avec une souche sauvage (Grobbelaar et al., 2011) comme évoqué dans les parties précédentes (cf. partie IV.A.4.f).

Un autre vaccin atténué, la souche MP-12, a été créé pour une utilisation potentielle à la fois chez les ruminants et l'Homme. Cette souche a été obtenue à la suite de plusieurs passages successifs de la souche sauvage ZH548, isolée chez un patient infecté durant l'épidémie de 1977 en Egypte, dans des cellules épithéliales humaines du poumon (MRC-5) en présence d'agent chimique mutagène (5-fluorouracil). Les immunisations par voie orale, intranasale ou intramusculaire chez le primate non humain à différentes doses (10^3 ou 10^4 pfu) ont montré l'induction d'anticorps neutralisants et l'absence d'effets secondaires (Morrill and Peters, 2011a, 2011b). Un essai clinique chez l'Homme a montré des résultats encourageants suite à la vaccination par MP-12. Des anticorps neutralisants ont été induits et étaient détectables 5 ans après l'immunisation (Pittman et al., 2016). Chez les brebis et vaches gestantes (Morrill et al., 1997) et chez les agneaux nouveau-nés (Morrill et al., 1991), qui sont des cibles prioritaires à protéger, le vaccin atténué MP-12 a induit la production d'anticorps neutralisants et a protégé contre une infection expérimentale. Malgré ces résultats encourageants, d'autres études ont observé des effets secondaires chez des femelles gravides en début de gestation suite à la vaccination (Hunter et al., 2002).

L'innocuité de ce vaccin atténué est donc discutable, d'autant plus que des risques de réversions sont possibles. L'alignement des séquences nucléotidiques de la souche atténuée par rapport à la souche originale ZH548 a montré 23 mutations réparties dans les 3 segments du génome viral. Trois mutations critiques localisées sur les gènes codant les protéines structurales Gn/Gc et l'ARN polymérase étaient suffisante pour conduire à une réversion de la souche atténuée (Ikegami et al., 2015).

b) Les vaccins de nouvelle génération

Face aux inconvénients des vaccins conventionnels, de nouveaux vaccins ont été développés. Les progrès en génie génétique, une meilleure compréhension de la virulence du vFVR et des réponses immunitaires impliquées dans la protection ont permis l'élaboration de nouvelles approches vaccinales contre le vFVR basées sur les propriétés suivantes : une immunogénicité à long terme et une protection idéalement en une seule vaccination, une innocuité, un coût de production abordable, une grande stabilité et la possibilité de distinguer un individu vacciné d'un individu infecté (DIVA, « Differentiating Infected from Vaccinated Animals »).

i. Les vaccins recombinants sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires sont constitués par une ou plusieurs protéines du pathogène utilisée(s) comme antigène. On distingue les vaccins sous-unitaires géniques, protéiques ou des pseudo-particules virales exprimant les antigènes d'intérêts (ou virus like particle « VLP ») (Faburay et al., 2017). Les glycoprotéines structurales Gn, Gc ont été les antigènes les plus utilisés dans cette stratégie.

-Les vaccins sous-unitaires géniques

Chez la souris, l'efficacité de la vaccination à ADN contre le vFVR est mitigée. L'injection d'un plasmide codant Gn et Gc par voie intramusculaire n'a pas induit d'anticorps neutralisants et n'a pas conféré de protection chez la souris (Wallace et al., 2006). La vaccination à ADN délivrée par « gene gun » contre le vFVR a montré des résultats prometteurs chez la souris. Cette méthode consiste à transfecter les cellules par propulsion de billes microscopiques sur lesquelles est adsorbé l'ADN (cf. partie IV.D.2.b). Trois immunisations avec un plasmide codant pour les glycoprotéines structurales Gn et Gc délivré par « gene gun » a induit des anticorps neutralisants et une protection totale chez la souris (100% de survie) (Spik et al., 2006). Une autre étude a montré la capacité d'un plasmide codant l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn (eGn) délivré par la même méthode à induire de faibles niveaux d'anticorps neutralisants et une protection partielle après 3 immunisations (80% de survie). Le potentiel vaccinal de la nucléoprotéine N a également été testé par « gene gun ». Quatre immunisations avec un plasmide codant la protéine N a induit la production

d'anticorps spécifiques et semblent conférer une protection partielle chez la souris (Lagerqvist et al., 2009). En effet, le nombre de souris présentant des signes cliniques après une infection expérimentale était diminué par rapport aux souris immunisées par un plasmide contrôle. Cependant dans cette étude, l'infection par la souche ZH548 n'a pas entraîné de mortalité contrairement à d'autres études (do Valle et al., 2010; Kreher Felix, Guillemot et al., 2014) et ce résultat ne nous permet pas de confirmer l'efficacité du plasmide vaccinal testé.

La vaccination à ADN contre le vFVR a été testée chez le mouton. Trois immunisations par un plasmide codant les protéines NSm-Gn-Gc mélangé avec de la lipofectin par voie intradermique et intramusculaire n'a induit aucune réponse cellulaire ni de production d'anticorps détectables (Lorenzo et al., 2008).

-Les vaccins sous-unitaires protéiques

L'immunisation par l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn (eGn) produite en cellules d'insectes en présence d'adjuvant a induit des anticorps neutralisants et a conféré une protection contre une infection expérimentale chez la souris (100% de survie) (de Boer et al., 2010). Des résultats similaires ont été confirmés chez l'agneau. La protéine eGn a conféré une protection clinique (absence de fièvre) mais une virémie résiduelle était détectable, bien qu'elle était significativement diminuée par rapport aux agneaux non vaccinés (Kortekaas et al., 2012). Une autre étude a également montré l'induction d'anticorps neutralisants et une protection complète (absence de virémie et de fièvre) médiée par l'immunisation concomitante des protéines eGn et Gc chez le mouton (Faburay et al., 2016). De manière similaire à la vaccination par un plasmide codant la protéine N, l'immunisation par la protéine N a induit une protection partielle chez la souris (60% de survie) (Wallace et al., 2006).

-Les VLPs

Les VLPs exemptes de matériel génétique sont produites par transfection ou transformation de plasmide codant les protéines virales d'intérêt dans des systèmes d'expressions eucaryotes ou bactériens (Vicente et al., 2011). Les protéines recombinantes s'auto-assemblent et forment des VLPs qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles possèdent l'avantage d'être inoffensives et de présenter une morphologie similaire au virus. L'immunisation par des VLPs portant les glycoprotéines Gn et Gc (VLP-GnGc) en l'absence ou en présence

d'adjuvant a induit des anticorps neutralisants (Boer et al. 2010). Les souris immunisées avec des VLP-GnGc en présence d'adjuvant étaient totalement protégées contre une infection expérimentale (100% survie, ARN viral non détectable dans le cerveau et le foie). L'ensemble des études indique le potentiel vaccinal prometteur des VLPs contre le vFVR mais une limite majeure de cette stratégie vaccinale est son coût de production élevé à grande échelle (Faburay et al., 2017).

ii. Les vecteurs viraux

Cette stratégie consiste à réaliser une expression hétérologue d'un antigène d'intérêt dans un virus par génie moléculaire. Des essais chez le mouton ont montré l'induction d'anticorps neutralisants contre le vFVR suite à l'immunisation par le virus recombinant de l'herpès équine (EHV-1-GnGc) (Said et al., 2017). Les études ont montré des résultats mitigés sur la protection contre le vFVR selon le vecteur viral employé. L'immunisation par le virus de la dermatose contagieuse exprimant Gn et Gc (LSDV-GnGc) (Wallace et al., 2006) ou le virus recombinant de la maladie de Newcastle exprimant également ces deux glycoprotéines (NDV-GnGc) (Kortekaas et al., 2012) a induit une protection clinique (absence de fièvre) chez des moutons. Une autre étude a montré une protection et l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants ($\geq 10^3$) chez les bovins, caprins et ovins par l'utilisation d'un adénovirus simien exprimant Gn et Gc (ChAdOx1-GnGc) (Warimwe et al., 2016). Des titres anticorps neutralisants plus modestes ont été mesurés chez les camélidés vaccinés par ce vecteur. Il pourrait être un candidat potentiel pour un essai clinique chez l'Homme. Enfin, une étude n'a montré aucune protection chez des agneaux immunisés par le poxvirus Vaccinia Ankara exprimant Gn et Gc (MVA-GnGc) suite à une infection expérimentale (Busquets et al., 2014).

iii. Les virus génétiquement atténués

Le clone 13 fut le premier virus génétiquement atténué et il est utilisé comme vaccin en santé vétérinaire depuis 2010 (Faburay et al., 2017). Isolé chez un cas humain non fatal infecté par le vFVR, l'analyse de son génome a montré une délétion de 69% du gène codant pour le facteur de virulence NSs (Muller et al., 1995). Cette souche naturellement atténuée a montré son innocuité (absence de fièvre, d'avortement ou de malformation du fœtus) et sa capacité à

induire des anticorps neutralisants chez des ruminants (moutons, chèvres, bovins) non gestantes et gestantes à différents temps de gestation (Dungu et al., 2010; Njenga et al., 2015). Cependant, une autre étude a montré la capacité de la souche atténuée à traverser la barrière placentaire et à induire des avortements et des malformations chez des brebis gestantes suite à la vaccination par le clone 13 à des doses élevées ($\sim 7 \log_{10}$ TCID₅₀) (Makoschey et al., 2016). Plus récemment une souche clone 13 thermostable a montré son efficacité et son innocuité chez des chèvres gestantes (Daouam et al., 2016).

D'autres souches atténuées ont été créées par l'introduction de délétions dans le génome viral à partir de la souche sauvage virulente ZH501 ou de la souche atténuée MP-12. L'immunisation par la souche ZH501 présentant une double délétion des gènes codant NSs et NSm induit des anticorps neutralisants, n'entraîne pas d'avortement et confère une protection complète chez les brebis gestantes suite à une infection expérimentale (absence virémie et de fièvre) (Bird et al., 2011). Des résultats encourageants ont été obtenus avec les souches MP-12 déficientes pour le gène NSm (arMP-12- Δ NSm21/384) et NSs (arMP-12 Δ NSs16/198). Leur innocuité a été montrée chez des brebis gestantes et la souche arMP-12 Δ NSs16/198 a montré une plus faible immunogénicité que la souche arMP-12- Δ NSm21/384 (Morrill et al., 2013). Après une injection de la souche arMP-12- Δ NSm21/384, des anticorps neutralisants sont induits chez des moutons (Weingartl et al., 2014) et protège contre une infection expérimentale chez le mouton (Weingartl et al., 2014).

Une autre souche atténuée particulière, qui présente une délétion pour le gène codant NSs et contenant 4 segments, nommée « RVFV-4s », a été créée en séparant le segment M en 2 segments (l'un code une polyprotéine NSm-Gn et l'autre Gc) (Schreur et al., 2017). A haute dose ($10^{7.1}$ TCID₅₀), ce vaccin induit des anticorps neutralisants, n'induit pas d'effet secondaire chez des brebis gestantes et n'est pas capable de traverser la barrière placentaire.

Enfin, une souche réassortie nommée R566 et qui possède le segment S du clone 13 et les segments L et M de la souche MP-12 a été créée par co-infection *in vitro* dans des cellules Vero (Kortekaas et al., 2014). Chez des agneaux expérimentalement infectés, une seule injection de ce réassortant induit une protection partielle (virémie détectée) par rapport à celle observée avec le clone 13.

Bien que ces vaccins atténués, plus sûrs que les vaccins de première génération, semblent être prometteurs, le risque de réversion, qui ne peut pas être totalement exclu, représente leur inconvénient majeur.

2. Les modèles d'études

Deux modèles principaux ont été utilisés pour l'étude de l'efficacité des vaccins contre le vFVR : la souris et le mouton, l'hôte naturel le plus susceptible du virus.

a) La souris

La souris est un modèle d'étude qui a été largement utilisé pour l'étude de l'efficacité de candidats vaccins contre le vFVR. En effet, la souris est sensible à l'infection par le vFVR et les symptômes qu'elle développe sont assez similaires à ceux observés chez l'Homme (Smith et al., 2010). Selon le fond génétique (BALB/c, C57BL/6, MBT/Pas), le sexe (Tokuda et al., 2016), la voie d'infection, la dose (létale, sub-létale) (Dodd et al., 2014), et la souche virale utilisée, 4 issues possibles ont été observées suite à l'infection: une infection asymptomatique, une infection résolutive, une infection avec atteinte hépatique fulminante ou une évolution lente et progressive vers des troubles neurologiques (encéphalite, paralysie des membres).

L'infection aiguë par le vFVR est caractérisée une phase aiguë associée à une léthargie (Ikegami and Makino, 2011), une atteinte hépatique caractérisée par une augmentation d'enzymes du foie dans le sang et une mortalité qui survient entre 3 et 5 jours post-infection (Lathan et al., 2017; Smith et al., 2010). Une étude a montré que l'infection par le vFVR a une atteinte majoritairement hépatique (Gommet et al., 2011). Des analyses post mortem ont montré des nécroses des hépatocytes ainsi que des lésions dans les organes lymphoïdes (rate, thymus) (Smith et al., 2010).

Pour les souris infectées ayant survécu à cette phase aiguë, l'infection est soit résolutive (Lathan et al., 2017) soit des troubles neurologiques apparaissent. Une infection des cellules neuronales est observée à des temps d'infection plus tardifs (≥ 8 jours) (Smith et al., 2010) qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire avec une infiltration de lymphocytes T dans le cerveau (Dodd et al., 2014).

Les différences de sensibilité observées entre les lignées suite à l'infection par le vFVR ont été associées à des facteurs génétiques de l'hôte. La susceptibilité a été comparée entre une souris sauvage issue d'un ancêtre *Mus musculus musculus* appelée MBT/Pas capturée en 1980 et une souris consanguine classique BALB/c (do Valle et al., 2010). L'infection de souris MBT/Pas entraîne une mortalité de 100% à des temps précoces avec une virémie élevée (do

Valle et al., 2010; Lathan et al., 2017) tandis que l'infection des souris BALB/c entraîne une virémie plus faible, une mortalité plus tardive ou une infection résolutive/asymptomatique (20% de survie). Cette sensibilité contraste avec la résistance des souris MBT/Pas au virus de la grippe ou au virus de la fièvre de West Nile. La comparaison des réponses immunitaires suite à l'infection a montré la mise en place d'une réponse antivirale interféron de type I plus faible et tardive chez des souris MBT/Pas qui serait à l'origine de cette sensibilité. Enfin, une autre étude a également montré une résistance plus élevée chez des femelles BALB/c par rapport aux mâles indiquant une susceptibilité en fonction du sexe (Tokuda et al., 2016).

b) Le mouton

Le mouton est un modèle idéal pour l'étude de l'efficacité des vaccins contre le vFVR puisqu'il figure parmi les hôtes naturels les plus sensibles. Les infections expérimentales de moutons de races européennes (Busquets et al., 2010; Faburay et al., 2016; Kortekaas et al., 2012) ou africaines (Tomori and Schmitz, 1996) et d'âges différents par différentes souches sauvages du vFVR ont montré des symptômes similaires à une infection naturelle (cf. partie IV.A.3.c).

3. Les réponses immunes impliquées dans la protection

a) Les réponses humorales

La production d'anticorps neutralisants est un critère déterminant qui est systématiquement recherché lorsque des vaccins sont testés chez les ruminants. Les études pionnières réalisées par Baesselar et Blackburn ont montré le rôle protecteur des anticorps monoclonaux neutralisants anti-Gn et anti-Gc contre le vFVR par transfert passif chez la souris (Besselaar and Blackburn, 1991). Ainsi l'immunisation par les vaccins sous-unitaire basés sur eGn, Gn et Gc induit des anticorps neutralisants. Les sites de liaisons reconnus par certains anticorps monoclonaux neutralisants protecteurs anti-Gn sont exposés à la surface de la partie globulaire de Gn (eGn) (Rusu et al., 2012). Des analyses structurales ont identifié deux domaines particuliers situés dans cette partie globulaire reconnue par des anticorps neutralisants. L'un d'entre eux présente une structure conservée parmi les virus du genre

Phlebovirus et serait potentiellement ciblé par des anticorps à spectre large tandis que l'autre domaine présente une structure spécifique au vFVR (Wu et al., 2017). L'ensemble de ces études indique que la protéine Gn et plus particulièrement eGn est une cible vaccinale pertinente.

De manière intéressante, l'immunisation par le clone 13 chez des veaux a induit de faibles titres d'anticorps neutralisants (1/32 à 1/64) par rapport à ceux observés chez les veaux vaccinés par la souche atténuée Smithburn (1/192 à $\geq 1/562$) et a conféré une protection contre une infection expérimentale (Von Teichman et al., 2011). Des anticorps non neutralisants pourraient être induits par la vaccination et leurs rôles ainsi que ceux des LTs restent à être étudiés dans la protection. Une autre étude a mis en évidence une protection partielle médiée par des anticorps anti-eGn faiblement neutralisants par transfert passif chez la souris, suggérant leur rôle substantiel durant l'infection (Bhardwaj et al., 2010). A l'heure actuelle, le mécanisme d'action des anticorps neutralisants et non neutralisants n'a pas été élucidé.

Les anticorps dirigés contre la nucléoprotéine N ne sont pas neutralisants et n'ont probablement pas un rôle majeur dans la protection. Toutefois, une étude a montré que l'immunisation des souris par la protéine N purifiée a induit des anticorps non neutralisants et les souris ont été partiellement protégées après une infection expérimentale. Le rôle des anticorps et la contribution de la réponse cellulaire anti-N n'ont pas été analysés dans cette étude (Wallace et al., 2006).

b) Les réponses cellulaires

Le rôle des réponses cellulaires dans la protection contre une infection par le vFVR a été peu exploré. Pour identifier les rôles respectifs des LTs CD4⁺ et LTs CD8⁺, une expérience de déplétion des LTs a été réalisée par injection d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 chez des souris naïves avant une épreuve virale (Dodd et al., 2013). Classiquement, l'infection par une souche sauvage ZH501 induit une mortalité rapide dès 2 à 4 jours post-infection chez des souris naïves (Dodd et al., 2012; Mandell et al., 2010). Dans cette étude de déplétion des LTs, les auteurs ont choisi d'utiliser une souche atténuée ZH501 qui possède une délétion pour le gène NSs (ZH501 Δ NSs) comme modèle pour l'infection pour comprendre l'importance des réponses cellulaire et humorale mises en place au cours de l'infection. La déplétion des LTs

CD8⁺ n'a pas impacté pas la survie suite à une infection expérimentale avec la souche ZH501ΔNSs. En revanche, la déplétion des LT CD4⁺ a affecté la production d'anticorps neutralisants, la clairance virale, a diminué la survie (60%) et a induit des lésions neurologiques plus sévères après infection par la souche ZH501ΔNSs par rapport aux souris naïves contrôles. Ces résultats suggèrent que les LT CD4⁺ ont un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire anti-vFVR et la clairance virale dans les tissus périphériques.

D'autres études ont mis en évidence des réponses anti-N et anti-Gn/Gc générées après vaccination chez la souris. L'immunisation par la souche atténué MP-12 a induit des réponses T CD8⁺ IFN γ anti-N robustes (Xu et al., 2013). L'injection d'un poxvirus MVA (Modified vaccinia virus Ankar) exprimant Gn et Gc (MVA-GnGc) a induit des réponses T CD8⁺ IFN γ anti-Gn et Gc (López-Gil et al., 2013). L'immunisation par un plasmide codant l'eGn délivré par « gene gun » en présence d'adjuvant a induit des réponses T IFN γ anti-eGn (Bhardwaj et al., 2010). Toutefois le rôle des réponses cellulaires anti-N, Gn et Gc dans la protection n'a pas été déterminé et reste à être élucidé.

C. Les cellules dendritiques et leurs potentiels vaccinaux

Les cellules dendritiques (DCs) forment un réseau complexe de sentinelles réparties dans divers tissus stratégiques (organes lymphoïdes, tissus périphériques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et sont des acteurs-clefs pour la mise en place du système immunitaire adaptatif. Les DCs sont classées en 2 populations majeures : les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et les plasmacytoïdes (pDCs). Elles possèdent chacune leurs spécificités et ont un rôle complémentaire lors d'une infection. Parmi les cellules professionnelles présentatrices d'antigènes (APCs), les DCs sont les seules à pouvoir effectuer la présentation croisée et elles activent à la fois les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (« priming ») (Delamarre et al., 2003; Jung et al., 2002). D'autre part, elles sont également capables de moduler la réponse immunitaire et d'induire une réponse tolérogène. Le ciblage des DCs ou autrement dit, l'adressage d'un antigène donné vers les DCs, offre la possibilité d'orienter le système immunitaire vers un type de réponse immunitaire particulier pour lutter contre des maladies infectieuses, des tumeurs ou contre des maladies auto-immunes (Alvarez et al., 2013; Kastenmüller et al., 2014). Nous verrons dans les parties suivantes les différentes étapes qui aboutissent à l'activation des DCs, l'apprêtement des antigènes et l'induction d'une réponse immunitaire effectrice.

1. Le rôle des cellules dendritiques dans la mise en place de la réponse immunitaire

Historiquement, les cellules de Langerhans (LCs) ont été le premier type de cellules DCs décrites par Paul Langerhans en 1868 dans l'épiderme de la peau humaine. Il observa des cellules ayant une morphologie particulière caractérisée par des prolongements cytoplasmiques similaires à des dendrites, d'où ils tirent leur nom. En 1973, les DCs présentes dans les organes lymphoïdes secondaires ont été observées pour la première fois par Ralph Steinman et Zanvil Cohn (Steinman, 1973). Cependant, leur rôle en tant que APCs n'a été mis en évidence qu'à partir de 1978. En effet, le groupe de Steinman a montré que les DCs isolées dans la rate expriment de manière constitutive le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II) et stimulent efficacement les lymphocytes T naïfs *in vitro* (Nussenzweig et al., 1980; Steinman et al., 1979; Steinman and Witmer, 1978).

a) L'activation de la DC

i. La reconnaissance du pathogène

Les cellules expriment une batterie de récepteurs leur permettant de reconnaître une diversité de pathogènes. Ces récepteurs ou PRRs (« pattern recognition receptor ») lient des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (« pathogen associated molecular patterns »), et des motifs associés aux dégâts cellulaires ou DAMPs (« damage associated molecular pattern ») (Brubaker et al., 2015). Les récepteurs Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs), NOD-like (NLRs), récepteurs de type C-lectine (CLRs) et les AIM2-like (ARLs) constituent les familles des PRRs et sont présents à la membrane mais également dans les compartiments intracellulaires. La reconnaissance des PAMPs induit une réaction inflammatoire locale par la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, permettant le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) et des DCs au point d'infection.

ii. La capture des antigènes

Les antigènes sont capturés par phagocytose impliquant les récepteurs FcR γ de type I et II, de type C-lectine, CD36, récepteur scavenger, et par endocytose via des récepteurs de type CLR (Roche and Furuta, 2015). Une fois internalisés, les antigènes sont apprêtés ou autrement dit, dénaturés et fragmentés dans les phagosomes ou dans le cytosol par digestion enzymatique pour être présentés aux lymphocytes T naïfs.

b) L'apprêtement des antigènes et la présentation antigénique

Selon la source de l'antigène (exogène ou endogène) et la molécule MHC engagée, la présentation antigénique donne lieu à l'activation des lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ (Figure 9) (Gutiérrez-Martínez et al., 2015).

i. La voie de présentation antigénique MHC I

-Antigènes endogènes

Le MHC I est exprimé de manière ubiquitaire à la membrane des cellules nucléées et est constitué de deux hétérodimères, une chaîne lourde de 45 kDa comportant 3 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) et une chaîne légère de 12 kDa ($\beta 2$ -microglobuline). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ correspondent au domaine de fixation du peptide, capable de charger des peptides de 8 à 10 acides aminés. Les antigènes endogènes présents dans le cytosol sont transportés vers le protéasome pour être dégradés en peptides. Ceux-ci sont ensuite transloqués dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par des transporteurs TAP ATP-dépendants (« transporter associated antigen »), où est synthétisé le complexe MHC I. Le peptide est ensuite chargé sur le complexe MHC I et exporté à travers l'appareil de Golgi à la membrane de la DC, puis présenté aux lymphocytes T CD8⁺.

-Antigènes exogènes

Les travaux de Bevan ont mis en évidence l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) à partir des antigènes d'origine exogène et présentés par le MHC I (Bevan 1976). Ce phénomène appelé présentation croisée (« cross-presentation ») est une fonction essentielle des DCs permettant de lutter efficacement contre des virus, des pathogènes intracellulaires. Parmi les APCs, les DCs sont les seules cellules à pouvoir exercer la présentation croisée. Plusieurs voies ont été décrites à ce jour : la voie TAP indépendante et dépendante. Dans le premier cas, les antigènes sont dégradés en peptides dans les compartiments endosomaux par des enzymes lysosomales et sont ensuite chargés sur les complexes MHC I, également présents dans ces compartiments. Dans le second cas, les antigènes endocytés sont relargués dans le cytosol. Le translocon Sec61 serait responsable de l'export des peptides des endosomes vers le cytosol (Gutiérrez-Martínez et al., 2015), toutefois son rôle a été récemment remis en question (Grotzke et al., 2017). Après leur acheminement vers le protéasome pour y être dégradés, les peptides dérivés des antigènes sont transloqués via TAP vers la lumière du RE ou dans les endosomes et chargés sur le MHC I.

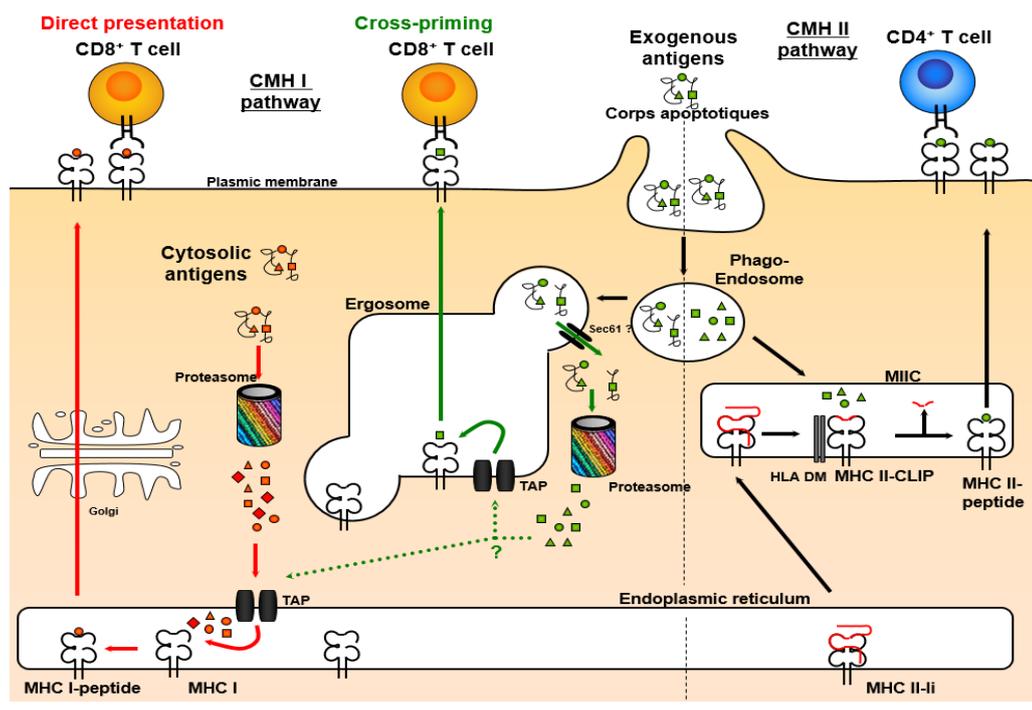


Figure 9 : Les différentes voies de présentation antigénique MHC I et II

Les antigènes endogènes présents dans le cytosol sont dégradés dans le protéasome, transloqués dans le RE puis chargés sur les MHC I pour être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ (flèche rouge). Les antigènes exogènes dégradés dans les phagosomes sont chargés soit sur des MHC I recyclés pour être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ ou cross-présentés (flèche verte) ou sur les MHC II (flèches noires) pour être présentés aux lymphocytes T CD4⁺. *Adaptée de Heath and Carbone, Nature Reviews Immunology 1, 126-134, (November 2001).*

ii. La voie de présentation antigénique MHC II

Le MHC II présente les peptides dérivés d'antigènes d'origine exogène (Roche and Furuta, 2015). Ce complexe est constitué de deux dimères formant 4 domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$, $\beta 2$). Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ constituent le domaine de fixation du peptide, pouvant charger des peptides de 13 à 25 acides aminés. Dans le RE, le MHC II est associé à la chaîne li qui bloque le site de fixation du peptide. Lors de son trafic vers les compartiments acides riches en MHC II, la chaîne est partiellement dégradée sous l'action du pH laissant une partie dans le site de fixation, appelé CLIP (« Class II-associated invariant chain peptide »). Celle-ci sera par la suite échangée à l'aide de la protéine chaperonne HLA-DM avec les peptides dérivés de l'antigène exogène qui auront été au préalable endocytés et dégradés dans les lysosomes puis acheminés vers le compartiment où demeure le MHC II. Le complexe peptide-MHC est ensuite exporté à la membrane de la DC et présenté aux lymphocytes T CD4⁺.

c) L'activation des lymphocytes T naïfs

Suite à l'apprêtement de l'antigène, les DCs subissent un changement phénotypique et fonctionnel appelé « maturation » (Thaiss et al., 2011). La capacité de phagocytose est diminuée tandis que l'expression du récepteur d'adressage CCR7 vers les organes lymphoïdes secondaires, du complexe MHC I et II, ainsi que les molécules de co-stimulation activatrices (CD80, CD86, CD40) est augmentée. Les DCs chargées en peptides migrent vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques en réponse au chimiotactisme exercé par les ligands du CCR7, les chimiokines CCL21 et CCL19, sécrétées par les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux lymphatiques et veinules depuis les organes lymphoïdes secondaires (Figure 10). Elles exercent alors leur fonction première de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs au niveau de la zone T para-corticale. Trois signaux d'activation sont nécessaires pour une expansion clonale et la mise en place d'une réponse effectrice et mémoire (Figure 11) :

- Le signal 1 : l'engagement du récepteur des cellules T (TCR)

La reconnaissance spécifique du complexe MHC-peptide par le récepteur transmembranaire TCR du lymphocyte T constitue le premier signal d'activation. La fixation du TCR au MHC-peptide induit une transduction du signal médiée par les molécules CD3, associées aux TCR à la membrane lymphocytaire. Une série de cascade de phosphorylations des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) aboutissent à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La fixation des co-récepteurs CD4 et CD8 sur le MHC II et I respectivement participerait à l'engagement du récepteur TCR (Koretzky, 2010).

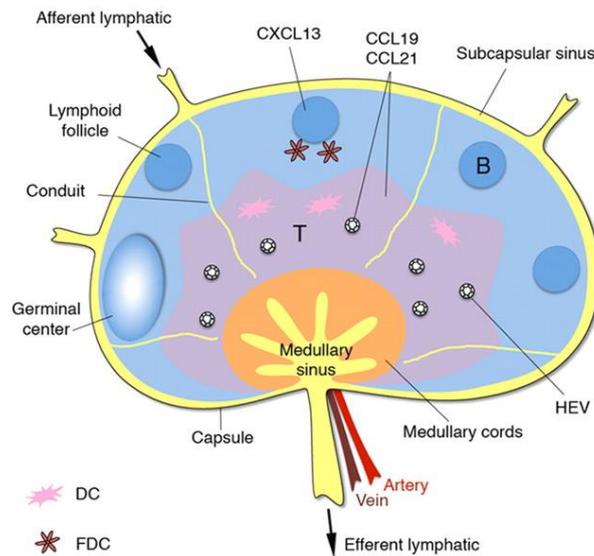


Figure 10: Structure d'un organe lymphoïde secondaire

Les organes lymphoïdes secondaires comprennent des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Les lymphocytes T et lymphocytes B sont localisés dans des zones particulières appelées respectivement zones T situées en paracorticale de l'organe et zones B situées à la périphérie. Les DCs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques et interagissent avec les lymphocytes T. Après activation des lymphocytes T, les lymphocytes B de hautes affinités se développent à l'aide des cellules dendritiques folliculaires (FDCs) aboutissant à la formation de centres germinatifs. *Adaptée de Nancy H. Ruddle et Eitan M. Akirav, J Immunol (August 15, 2009).*

- Le signal 2 : les signaux de co-stimulation

Le second signal nécessaire pour l'activation lymphocytaire est l'interaction entre les molécules de co-stimulation présentes à la surface de la DC et leurs partenaires sur le lymphocyte T. Les molécules de co-stimulation activatrices à la surface de la DC telles que le CD40, CD80/86, CD70, ICOS-L interagissent avec leurs partenaires à la surface du LT, le CD40L, CD28, CD27 et ICOS, respectivement. A l'inverse, l'interaction les molécules de co-stimulation inhibitrices empêche l'activation du lymphocyte T et aboutit à une réponse tolérogène (Koretzky, 2010). Les molécules de co-stimulation inhibitrices à la surface du lymphocyte T sont PD-1 qui lie PD-L1/L2 sur la DC, et CTLA-4 qui lie CD80/86 sur la DC.

- Le signal 3 : la sécrétion de cytokines

Le troisième signal d'activation correspond à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par la DC qui ont un rôle dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺, comme l'IL-12 qui participe à l'induction de lymphocyte T CD4⁺ au profil Th1.

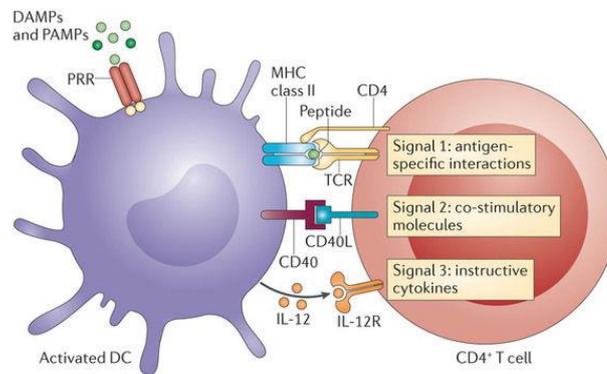


Figure 11: Les trois signaux d'activation

D'après Kambayashi et Terri M. Laufer, Nature Reviews Immunology 14, 719–730 (2014).

d) La réponse cellulaire : différenciation des lymphocytes T

L'activation d'un clone lymphocyte T CD8⁺ spécifique conduit à sa prolifération et à sa différenciation en CTL. La reconnaissance spécifique par les CTLs des complexes MHC-peptides présents sur les cellules infectées conduit à la sécrétion d'une part des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et TNF- α , et d'autre part, des molécules cytotoxiques telles que les perforines (protéines induisant la formation de pores à la membrane cellulaire) et les granzymes (sérines-protéases capables d'activer les caspases) dans le but d'induire l'apoptose des cellules infectées ou tumorales (Laidlaw et al., 2016).

La polarisation d'un lymphocyte T CD4⁺ activé en lymphocyte T auxiliaire (Th « helper ») effecteur ou folliculaire est régulée par des facteurs de transcriptions qui sont dépendant des signaux cytokiniques reçus et de l'affinité de la liaison TCR-MHC-peptide (DuPage and Bluestone, 2016). Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs sont caractérisés par le profil de cytokines qu'ils sécrètent (Tableau 1). Chaque lymphocyte T CD4⁺ effecteur est spécialisé dans une fonction donnée : la lutte contre un type de pathogène, le soutien du développement

des CTLs et lymphocytes T CD8⁺ mémoires, le développement des lymphocytes B, de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et le recrutement de cellules de l'immunité innée.

Tableau 1: Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Profils	Facteurs induisant la différenciation	Cytokines produites	Fonctions
Th1	IL-12, IL-27	IFN γ , IL-2, TNF- α	-Réponse inflammatoire -Réponse cellulaire -Lutte contre les pathogènes intracellulaires
Th2	IL-4 Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10	-Réponse anticorps -Réponse allergique -Lutte contre les pathogènes extracellulaires (bactéries et parasites)
Th9	IL-4, TGF β	IL-9, IL-10	-Lutte contre les infections parasitaires
Th17	IL-6, IL-23 Faible quantité de TGF β	IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF α , IL-10	-Lutte contre les infections bactériennes et fongiques -Recrutement des éosinophiles et neutrophiles
Th22	IL-10R β , IL-6, TNF- α	IL-22, IL-13, FGF, CCL15, CCL17, TNF α	-Immunité mucoale
Th25	IL-4, IL-25	IL-25, IL-4, IL-5, IL-13	-Immunité mucoale
Tfh	Fort signal TCR, IL-12, IL-21, IL-4	IL-21	-Soutien au développement de lymphocytes B
Treg	IDO Forte quantité de TGF β	IL-10, TGF β	-Régule la réponse immunitaire -Maintien de la tolérance

Adaptée de Tiffany Caza et Steve Landas, Biomed Res Int. 2015 ; Moon et al, Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2015) 3:51

e) La réponse anticorps

La génération d'anticorps spécifiques de haute affinité est un processus complexe qui nécessite la reconnaissance spécifique de l'antigène par le récepteur membranaire BCR du lymphocyte B et la coopération des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) (Heesters et al., 2016). L'engagement du BCR via la reconnaissance d'antigène soluble ou par la présentation par les APCs (DCs migratoires, les DCs résidentes, les DCs folliculaires ou par les macrophages présents dans la zone marginale de la rate ou tapissant le sinus sous capsulaire du ganglion) conduit à la migration du lymphocyte B vers la bordure de la zone B/T. L'interaction entre le lymphocyte B et un Tfh via la reconnaissance du complexe MHC-peptide-TCR entraîne son activation, sa migration vers le centre germinatif pour une expansion clonale. Dans le centre germinatif, le BCR subit plusieurs cycles d'hypermutations somatiques (ou maturation d'affinité). Les lymphocytes B ayant hypermutés leur BCR sont sélectionnés par interaction avec les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) du centre germinatif sur le critère d'affinité vis-à-vis de l'antigène qui leur est présenté par la FDC. Les lymphocytes B les moins affins entrent en apoptose tandis que les lymphocytes B les plus affins reçoivent un signal de survie. Ces derniers commutent la classe de leur immunoglobuline (IgM → IgG/E/A) et se différencient en lymphocyte B mémoire et en plasmocyte avec l'aide des Tfh, avant de quitter le centre germinatif (De Silva and Klein, 2015).

f) La régulation de la réponse immunitaire

i. Réponse tolérogène : DC à l'état basal versus activée

La tolérance périphérique est essentielle pour le maintien de l'homéostasie immunitaire. Elle est orchestrée par les DCs, et plus particulièrement par les DCs migratoires présentes dans les tissus périphériques (Idoyaga et al., 2014). A l'état basal (« steady state »), les DCs matures exercent une tolérance périphérique. En effet, une étude a montré que les DCs matures du thymus peuvent présenter un peptide du soi contrairement aux DCs immatures du thymus (Ardouin et al., 2016). Enfin, le ciblage des DCs à l'état basal via un anticorps dirigé contre un récepteur de surface et sans adjuvant induit des Tregs (Idoyaga et al., 2014), stratégie intéressante contre les maladies auto-immunes. En revanche, l'activation des DCs par l'utilisation d'adjuvant (anti-CD40, LPS, poly :IC) génère une réponse immunitaire effectrice

suite à son ciblage par un anticorps dirigé contre un récepteur de surface de DC (Hawiger et al., 2001).

ii. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) jouent un rôle essentiel contre l'exacerbation de l'inflammation, les maladies auto-immunes et les réponses allergiques (Caridade et al., 2013; Zhang et al., 2014). Le champ d'action des Tregs est varié. Ils interagissent avec les DCs, lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes B, les éosinophiles et les mastocytes. Elles surexpriment le récepteur de l'IL-2, le CD25, permettant de séquestrer l'IL-2 et empêche ainsi la prolifération des Th effecteurs. Ils sont également capables d'exercer une action immunosuppressive par contact direct via l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices (CTLA-4, OX40) ou d'autres molécules ayant des fonctions immunosuppressives (LAG-3, GITR, CD39, CD73). Ils peuvent également sécréter des cytokines régulatrices telles que l'IL-10, le TGF- β ou des composants lytiques, les granzymes et les perforines. Plusieurs sous-populations de Tregs ont été décrites (Zhang et al., 2014):

-les Tregs naturels (nTreg) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ sont présents dans le thymus

-les Tregs induits par les DCs (iTregs) CD4⁺ CD25⁺ sécréteurs d'IL10 et TGF- β et les Tr1 CD4⁺ CD25⁺ sécréteurs d'IL-10 uniquement, se différencient à partir des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans les tissus périphériques et ont une action similaire aux nTregs

-les T suppresseurs CD8⁺ FoxP3⁺ CD25^{hi} CD28^{hi} sont générés à partir de lymphocyte T CD8⁺ en présence de l'IL-12 et l'IL-4 et produisent une grande quantité d'IFN γ , TNF- α , de granzymes et perforines induisant l'apoptose des cellules cibles

2. Les cellules dendritiques

Les connaissances générées à partir des différentes populations de DCs localisées dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les différents tissus périphériques chez la souris, modèle d'étude de référence, ont permis d'étendre l'identification des DCs conservées dans l'évolution chez l'Homme et dans d'autres espèces ayant un intérêt biomédical, notamment le porc ou ayant un intérêt économique, vétérinaire et sanitaire. Une meilleure compréhension du système immunitaire chez l'Homme et dans ces modèles grands mammifères offre la possibilité d'établir des stratégies vaccinales « one health » contre des zoonoses (Crozat et al., 2010b; Vu Manh et al., 2015). La difficulté principale pour la caractérisation des populations de DCs réside dans l'identification de critères communs pour caractériser une population spécifique au travers des espèces. De plus, les marqueurs présents sur les DCs peuvent varier en fonction de leur localisation tissulaire pour une même sous-population de DCs (CD8 α ⁺ spléniques et les CD103⁺ tissulaires chez la souris). La plasticité des cellules du système immunitaire ajoute une difficulté supplémentaire sur la caractérisation des populations de DCs. A titre d'exemple, les monocytes peuvent se différencier en DCs en condition inflammation (appelés DCs dérivées de monocyte, moDCs). Les analyses de transcriptomes ont mis en évidence des signatures transcriptomiques propres à chacune des sous-populations de DCs (Miller et al., 2012). La combinaison de l'ensemble de ces données ont permis d'établir une nomenclature qui est généralement admise par la communauté scientifique (Guilliams et al. 2014; Murphy et al. 2016; Vu Manh et al. 2015).

a) Les cellules dendritiques conventionnelles

Les cDCs excellent dans la présentation antigénique et dans l'activation des lymphocytes T naïfs, et sont des candidates prometteuses pour la stratégie de ciblage des DCs. Elles sont divisées en 2 sous-populations: les cDC1 qui sont efficaces pour la présentation croisée et l'activation des lymphocytes T CD8⁺, tandis que les cDC2 sont plus efficaces dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺. On distingue les cDCs résidentes présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, les ganglions) et les cDCs migratoires dans les tissus périphériques et tissus non lymphoïdes (peau, muqueuses, poumon) qui migrent constitutivement vers les ganglions et acquièrent un phénotype mature (augmentation de l'expression des molécules de MHC II, de co-stimulation et la sécrétion de cytokine).

i. Les cDCs chez la souris

Les cDCs sont générées à partir de précurseurs hématopoïétiques communs aux monocytes et macrophages (MDP, « monocyte and dendritic cell progenitor »). Ces précurseurs se différencient ensuite en précurseurs hématopoïétiques communs aux DCs (CDP, « common dendritic precursor »). Le développement des cDCs dépend du facteur de croissance Flt3-L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) (Murphy et al., 2016). Elles sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription *zbtb46* contrairement aux pDCs et monocytes/macrophages (Satpathy et al., 2012).

-Les cDC1

Parmi les cDC1, on distingue les CD8a⁺ dans la rate et les ganglions et leur équivalent dans les tissus périphériques, les CD103⁺ CD11b⁻ (Miller et al., 2012). Leur développement est principalement gouverné par le facteur de transcription IRF8 (« interferon regulatory factor 8 ») et Baft3 (« basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3 ») (Edelson et al., 2010). Elles sont caractérisées par la surexpression de certains récepteurs tels que le XCR1, marqueur spécifique des cDC1 trans-espèces par excellence, le CLEC9A, le TLR3 (détection d'ARN double brin viraux) et d'autres récepteurs qui permettent de les distinguer par rapport aux autres DCs et macrophages (Dutertre et al., 2014) (Tableau 2).

Ces cDC1 sont capables de cross-présenter des antigènes exogènes et des corps apoptotiques (den Haan et al., 2000; Iyoda et al., 2002) et stimulent plus efficacement les lymphocytes T CD8⁺ par rapport aux cDC2 (Pooley et al., 2001; Seillet et al., 2013). Elles ont un rôle majeur dans la lutte contre des maladies infectieuses. Après une infection expérimentale avec *Leishmania major* ou *Toxoplasma gondii* chez des souris Baft3^{-/-}, la parasitémie est plus élevée et une réponse T CD8⁺ spécifique est déficiente (Martínez-López et al., 2015; Mashayekhi et al., 2011). La présence d'un grand nombre de récepteurs endocytiques impliqués dans la présentation croisée (cf chapitre suivant) ainsi qu'une machinerie cellulaire adaptée pour cette fonction contribueraient à cette spécialisation observée chez les cDC1 (Diana Dudziak et al., 2007). Par ailleurs, elles sont capables de maintenir un pH phagosomal alcalin, crucial pour une présentation croisée optimale (Savina and Amigorena, 2007). Les cDC1 sécrètent l'IL-12p40 lors d'une infection (Martínez-López et al., 2015; Mashayekhi et al., 2011) et elles promeuvent une réponse de type Th1 (Edelson et al., 2010; Hildner et al.,

2008; Martínez-López et al., 2015). Elles sécrètent également l'interféron de type I (IFN- α) et III (IFN- λ) après stimulation par les agonistes du TLR 3 (Lauterbach et al., 2010).

-les cDC2

La genèse des cDC2 dépend de l'IRF4, Notch2, RelB, l'IFR-4, Klf4, RBP/J (Murphy et al. 2016). Leur caractérisation a été plus complexe que celle des cDC1 puisqu'elles partagent certaines caractéristiques communes aux monocytes/macrophages. En effet, elles expriment toutes le CD11b, récepteur également présent sur les macrophages, les monocytes et les moDCs, et expriment le récepteur au Csf-1, marqueur aussi présent sur les monocytes/macrophages (Ginhoux et al., 2009). La distinction des cDC2 des moDCs et macrophages s'effectue par l'expression d'autres marqueurs tels que le CD64 (Schlitzer et al., 2013) et MAR-1 (Plantinga et al., 2013). Les moDCs sont CD11b⁺ MAR-1⁺ CD64⁺ et les cDC2 sont CD11b⁺ CD64⁻. On distingue les cDC2 résidentes qui sont CD11b⁺ CD64⁻ CD4⁺ MAR-1⁻ des cDC2 migratoires qui sont CD11b⁺ CD64⁻ CD4⁻. Les cDC2 expriment le TLR4 contrairement aux cDC1 (Kastenmüller et al., 2014). Par ailleurs, les cDC2 expriment communément le récepteur SIRP α , récepteur dont l'expression conservée au cours de l'évolution à travers les espèces phylogénétiquement éloignées a été mis en évidence par notre équipe (Manh et al., 2015).

Les cDC2 sont capables d'effectuer la présentation croisée dans certaines conditions d'activation mais stimulent plus efficacement les lymphocytes T CD4⁺ (D. Dudziak et al., 2007) par rapport aux cDC1. Elles sont caractérisées par la capacité à sécréter l'IL-6 (Persson et al., 2013) et l'IL-23 (Schlitzer et al., 2013) lors d'une stimulation. Elles peuvent induire des réponses de type Th2 lors d'une réaction allergique (Plantinga et al., 2013) et Th17 après stimulation par le (lipopolysaccharide) LPS, agoniste du TLR4, lors d'une infection pulmonaire (*Aspergillus fumigatus*) (Persson et al., 2013; Schlitzer et al., 2013).

ii. Les cDCs chez l'Homme

La majorité des études chez l'Homme ont été réalisées à partir de DCs isolées du sang et de la peau. La genèse des cDCs serait liée à au facteur de transcription IRF8 et de croissance Flt3-L, également impliqués dans le développement des cDCs chez la souris, et

enfin du facteur de transcription GATA2. En effet, les patients portant des mutations sur les gènes codant pour l'IFR8 (Breton et al., 2015) et GATA2 (Dickinson et al., 2014) sont dépourvus de DCs dans le sang et l'injection de Flt3-L sur des volontaires sains induit une augmentation de DCs dans le sang. Comme chez la souris, les cDCs sont divisées en deux sous-populations : les BDCA3⁺/CD141⁺ (cDC1), qui sont l'équivalent des CD8a⁺ murines et les BDCA1⁺/CD1c⁺ (cDC2), qui sont l'équivalent des CD11b⁺ murines (Tableau 2).

-les cDC1

Les cDCs CD141⁺ présentes dans le sang, dans les organes lymphoïdes et dans les tissus périphériques sont caractérisées par l'expression des récepteurs XCR1 et CLEC9A (Jongbloed et al., 2010; Murphy et al., 2016). Elles expriment de nombreux TLRs dont le TLR 3 et les facteurs Baft3, l'IFR8 mais pas l'IFR4, comme chez la souris. Les cDC1 présentes dans la peau et dans le sang exercent plus efficacement la présentation croisée que les cDC2 après stimulation (poly :IC ou LPS) (Bachem et al., 2010; Haniffa et al., 2012). Cependant cette spécialisation des cDC1 à réaliser la cross-présentation est moins fréquemment observée chez l'Homme par rapport à la souris dans les différentes études et serait dépendant de la nature des antigènes (Segura et al., 2013a). Les cDC1 induisent une meilleure réponse de type Th1 par rapport aux cDC2 *in vitro* (Jongbloed et al., 2010). Les CD141⁺ dermiques sont capables d'induire une réponse de type Th2 (Yu et al., 2013), Th17 (Segura et al., 2012) et Tregs (Chu et al., 2012) dans certains contextes. Elles sécrètent l'IL-12p70 et l'IFN-λ après stimulation (Lauterbach et al., 2010), caractéristiques également retrouvées chez les cDC1 murines.

-les cDC2

Dans le sang et la peau, les cDC2 correspondant aux cDCs BDCA1⁺ expriment communément les récepteurs CD11b, SIPRα (Durand and Segura, 2015). Les cDC2 présentes dans le sang expriment les TLRs 1, 2, 4, 6, 8. Une étude suggère que les cDC2 issues d'organes lymphoïdes sont capables de réaliser la présentation croisée aussi efficacement que les cDC1 (Segura et al., 2013a). Les cDC2 spléniques, sanguines, pulmonaires induisent une réponse type Th17 suite à une exposition du pathogène *Aspergillus fumigatus* et peuvent sécréter de haut niveau d'IL-17, d'IL-23 (Schlitzer et al., 2013) comme les cDC2 murines.

Elles sont capables de sécréter l'IL-12p70 après stimulation par des ligands TLRs (LPS, R488) (Nizzoli et al., 2013).

L'ensemble des études montrent qu'il existe une spécialisation fonctionnelle des cDC1 et des cDC2 humaines mais qui est moins nette que chez les cDC murines.

iii. Les cDCs les moutons

Les premiers essais de caractérisation des DCs chez le mouton ont été réalisés à partir des cellules issues de la lymphe pseudo-afférente collectées par la technique de cannulation lymphatique mise au point par l'équipe de MacConnell au niveau du ganglion poplité (Bujdoso et al., 1989). Cette technique consiste à faire une résection d'un ganglion lymphatique drainant, dans une région anatomique définie. La cicatrisation du vaisseau lymphatique afférent et efférent aboutit à la formation d'un vaisseau unique appelé vaisseau pseudo-afférent. Grâce à un cathéter inséré dans ce vaisseau nouvellement formé relié à un récipient de collection, il est possible de collecter les leucocytes enrichis en cellules dendritiques issus des tissus périphériques dans un état le plus physiologique possible (Bujdoso et al., 1989; Schwartz-Cornil et al., 2006). Ces DCs expriment le MHC II et le CD1b et sont capables de capturer des antigènes exogènes et d'induire la prolifération des lymphocytes T (Bujdoso et al., 1989). Les DCs collectées à partir de la lymphe pseudo-afférente constituent un puissant modèle pour la caractérisation des populations de DC. Leur caractérisation a été réalisée dans la lymphe drainant la région intestinale (cannulation mésentérique, jéjunum) (Pernthaler et al., 2002), la région oro-nasale (cannulation cervicale) (Eparaud et al., 2004) et drainant la peau (cannulation précapsulaire ou poplitée) (Contreras et al. 2010).

-Les cDC1 et les cDC2

Les études pionnières sur la caractérisation des cDCs chez le mouton menées par notre équipe ont permis l'identification des sous-populations de cDCs homologues de la souris, de l'Homme et du mouton qui sont résumées dans le tableau 2.

Deux populations distinctes dans la lymphe drainant la peau ont été mises en évidence: une population minoritaire les CD26⁺ SIRP α ⁻ CD1b⁺ et une population majoritaire les CD26⁻

SIRP α^+ CD1b $^+$ (Contreras et al. 2010; Epardaud et al. 2004). Pour vérifier si ces deux populations sont homologues des cDC1 et des cDC2 humaines et murines, les transcriptomes des populations ont été comparés. Les résultats ont montré que les CD26 $^+$ SIRP α^- CD1b $^+$ correspondent à des cDC1 et les CD26 $^-$ SIRP α^+ CD1b $^+$ à des cDC2 humaines et murines (Contreras et al., 2010). Par ailleurs, notre équipe a également montré l'expression sélective du gène codant XCR1 sur les CD26 $^+$ SIRP α^- CD1b $^+$ (cDC1) et dont l'expression est exclusive sur les cDC1 chez des mammifères phylogénétiquement éloignés (Homme, mouton et souris) (Croizat et al., 2010a). Le marqueur CADM1 a également été mis en évidence sur les cDC1 ovines lors de ces études et est devenu très utilisé pour caractériser les cDC1 dans d'autres espèces telles que le singe et le porc (Dutertre et al., 2014).

Dans la lymphe, les cDC1 sont CD26 $^+$ SIRP α^- CD1b $^+$ CLEC9A $^+$ CADM1 $^+$ DEC205 $^{\text{high}}$ MHCII $^+$ CD11c $^+$ et les cDC2, CD26 $^-$ SIRP α^+ CD1b $^+$ CADM1 $^-$ DEC205 $^{\text{lo}}$ MHCII $^+$ CD11c $^+$. Les cDC1 sont capables de sécréter une plus grande quantité d'IL12p40 par rapport au cDC2 comme chez la souris. Par rapport au cDC2, elles stimulent plus efficacement les lymphocytes T CD8 $^+$ par la sécrétion d'IFN γ . Elles sont également plus efficaces par rapport au cDC2 pour la présentation croisée aux lymphocytes T CD8 $^+$ (Contreras et al. 2010). Toutefois, les cDC1 et les cDC2 sont toutes les deux capables de stimuler les lymphocytes T CD4 $^+$. Enfin, les cDC1 ovines sont spécialisées dans la capture des corps apoptotiques, caractéristique également retrouvée chez les cDC1 murines (Contreras et al. 2010; Epardaud et al. 2004).

Les cDCs dans les tissus périphériques ont été moins bien caractérisées par rapport aux cDCs de la lymphe. Dans la peau et les ganglions, les cDCs partagent un profil similaire avec les cDCs de la lymphe (Contreras et al. 2010). D'autres études ont essayé de caractériser les DCs dans l'intestin et les poumons mais les cDCs n'ont pas été formellement identifiées. Dans l'intestin, les DCs putatives majoritairement présentes au niveau de la *lamina propria* co-expriment le MHCII, DEC205, CD209, CD11c mais pas le CD1b, récepteur pourtant présent sur les cDCs de la lymphe (Åkesson et al., 2008). Dans les poumons, les DCs putatives présentes au niveau du parenchyme co-expriment le MHCII, DEC205 et CD11c (Fach et al., 2006).

Tableau 2: Comparaison des cDCs trans-espèces

	cDC1	cDC2
<i>Souris</i>		
Nom	CD8a⁺ (OL) CD103⁺ CD11b⁻ (ONL)	CD11b⁺ CD4⁺ (OL) CD103⁻ CD11b⁺ (ONL)
Autres marqueurs	CADM1 ⁺ , XCR1 ⁺ , CLEC9A ⁺ , TLR3 ⁺	SIRPα ⁺
Facteur de transcription ou de croissance	Flt3-L, Baft3, IRF8, Id2	Flt3-L, IRF4, Notch, RelB, Csf-1r, Klf4, RBP/J
<i>Homme</i>		
Nom	CD141 (BDCA3)⁺	CD1c (BDCA1)⁺
Autres marqueurs	CADM1 ⁺ , XCR1 ⁺ , CLEC9A ⁺ , DEC205 ^{hi} , CD162 ^{hi} , TLR3 ⁺	SIRPα ⁺ , CD11b ^{+/lo} , CD11c ⁺
Facteur de transcription ou de croissance	Flt3-L, Baft3, IRF8	Flt3-L, IRF4
<i>Mouton</i>		
Nom	CD26⁺ SIRPα⁻	CD26⁻ SIRPα⁺
Autres marqueurs	Cadm1 ^{hi} , CD26 ⁺ , XCR1 ⁺ , CLEC9A ⁺ , TLR3 ⁺	CD11c ⁺ , DEC205 ^{lo}
Facteur de transcription ou de croissance	-	-
Fonctions spécialisées communes	Présentation croisée efficace Activation des lymphocytes T CD8 ⁺ Réponse type Th1 Sécrétion d'IL-12 et IFN-λ	Activation des lymphocytes T CD4 ⁺ Réponse type Th2/Th17 Sécrétion IL-23, IL-6

OL: Organes lymphoïdes secondaires ; ONL : Organes non lymphoïdes

Adaptée de C. Dutertre et al, *Cell Immunology*, 2014 ; T. Vu Manh et al,

Frontiers in Immunology, 2015

b) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

Les pDCs ont été d'abord identifiées chez l'Homme (Facchetti et al., 1988; Siegal, 1999). Présentes dans le sang, la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes, elles sont capables de migrer vers les tissus périphériques lors d'une inflammation. Les pDCs se différencient à partir du progéniteur commun aux cellules dendritiques (CDP), et leur genèse est dépendante du Flt3-L et du facteur de transcription E2-2 (Durand and Segura 2015). Les pDCs expriment le TLR 7 reconnaissant des ARN simples brin et le TLR 9 reconnaissant les dinucléotides CpG non méthylés. Les TLR 7 et 9 sont localisés dans les endosomes. Les pDCs possèdent la particularité de sécréter une grande quantité d'IFN de type I (l'IFN- α,β), essentielle dans l'immunité antivirale (Swiecki and Colonna, 2015). Cette particularité est attribuée à l'expression constitutive du facteur 7 de régulation de l'interféron (IRF7) (Reizis et al. 2011).

A l'état basal, les pDCs expriment faiblement le MHC II, ainsi que les molécules de co-stimulation, et sont peu efficaces dans la capture d'antigène. En revanche, une fois stimulées par des acides nucléiques ou par des virus, elles subissent une maturation (augmentation du MHCII, CD80, CD86 et du CD40) et acquièrent la capacité d'activer les lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Nakano et al., 2001; Reizis et al., 2011). A la différence des cDCs, le complexe MHC II est continuellement synthétisé et renouvelé à la surface après l'activation de la pDC. De façon surprenant elle demeure moins efficace pour activer les lymphocytes T CD4⁺ (Young et al., 2008). Néanmoins, le ciblage des antigènes vers les pDCs *ex vivo* induit l'activation des lymphocytes T (Tel et al., 2013). Elles ont également la possibilité d'induire une réponse tolérogène en fonction du contexte. *In vitro*, elles peuvent induire les Tregs. Par ailleurs, une étude a rapporté que la déplétion des pDCs de souris qui suivent un régime riche en protéine a pour conséquence une inflammation hépatique associée à une réponse T (Goubier et al., 2013).

c) Les autres phagocytes mononucléées : les moDCs et les Langerhans

-Les moDCs

En condition basale et plus favorablement en condition d'inflammation, les monocytes présents dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes peuvent acquérir un phénotype ainsi que des fonctions similaires à ceux des cDCs, d'où leur dénomination de cellules dendritiques dérivées de monocyte (moDC) ou cellules dendritiques inflammatoires (infDC) (Mildner and Jung, 2014). Chez la souris, elles sont CD11b⁺ CD11c⁺ CD14⁺ Ly6C⁺ CD64⁺ MERTK^{-low} (Malissen, Tamoutounour, and Henri 2014). Les moDCs chez l'Homme ont été identifiées, notamment les CD14⁺ du derme, les CD103⁻ CD172⁺ de l'intestin et les CD1c⁺ CD14⁺ CD1a⁺ présents dans les tissus suite à une inflammation (Guilliams et al., 2014).

Elles ont un rôle dans la mise en place d'une réponse inflammatoire locale lors d'une infection chez l'Homme et chez la souris. Chez l'Homme, les moDCs prélevées à partir d'ascites chez des patients atteints d'arthrite induisent la sécrétion d'IL-17 des lymphocytes T CD4⁺ autologues (Segura et al., 2013b). Chez la souris, les moDCs induisent une réponse cellulaire IFN γ robuste lors d'une infection cutanée par *Leshmania major* dans le derme (León et al., 2007). Elles induisent une réponse de type Th2 par la sécrétion l'IL-5 et l'IL-10 lors d'une réaction allergique chez la souris (Plantinga et al., 2013). Les CD1c⁺ du derme semblent être spécialisées dans l'activation des Tfh pour l'induction des réponses anticorps.

- Les Langerhans

Les cellules de Langerhans sont les seules APCs présentes dans l'épiderme à l'état basal et sont considérées comme la première ligne de défense contre des pathogènes (Collin and Milne, 2016). Elles sont capables de capturer des antigènes à la surface de l'épiderme par extension de leurs dendrites au travers des jonctions serrées entre les kératinocytes (Ouchi et al., 2011). Chez la souris elles sont caractérisées par l'expression du MHCII, CD11c, DEC205, EpCAM, E-cadhérine, SIRP α , DC-SIGN et le CD207. Chez l'Homme, elles sont caractérisées par l'expression du MHC II, CD1a, CD11b, EpCAM, BDCA1 et CD207 (Elodie Segura, 2010).

Elles possèdent des marqueurs communs aux cDCs et sont capables de présenter des antigènes, toutefois les analyses transcriptomiques ont montré qu'elles s'apparentent plus aux

macrophages qu'aux cDCs (Miller et al., 2012). Chez la souris, elles se renouvellent et se différencient à partir d'un pool de précurseurs originaires du sac vitellin et également à partir de précurseurs issus du foie fœtal qui ont colonisé l'épiderme embryonnaire avant la naissance (Malissen et al., 2014). Cependant, lors d'une inflammation sévère, les LCs peuvent se renouveler à partir des précurseurs monocytaires originaire de la moelle osseuse circulant dans la sang (Romani et al., 2010).

Les LCs sont capables d'activer une réponse mais également de la réguler selon le contexte. Chez la souris, les LCs induisent une réponse Th17 *in vivo* lors d'une infection par *Candida albicans* et ont un rôle dans la mise en place d'une réponse humorale (Igyártá et al., 2012; Ouchi et al., 2011) ou régulatrice durant une infection par *Leishmania major* (Kautz-neu et al., 2011). Chez l'Homme, les LCs extraites à partir de biopsies de peau, cultivées *in vitro* avec les lymphocytes T sont capables de stimuler des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ naïfs et d'induire une réponse de type Th2, Th17, Treg (Fujita et al., 2009; Haniffa et al., 2012; Klechevsky et al., 2008; Seneschal et al., 2012). Toutefois, les LCs ne sont pas capables de polariser ces lymphocytes T naïfs en Tfh (Klechevsky et al., 2008).

3. Les récepteurs endocytotiques d'intérêt pour le ciblage des DCs

De nombreux récepteurs de surface ont été utilisés (Alvarez et al., 2013; Kastenmüller et al., 2014). Les récepteurs dont l'expression est conservée sur les DCs entre espèces et qui ont montré une amélioration de la réponse immunitaire suite à leur ciblage seront décrits précisément dans cette partie.

a) Les principaux récepteurs utilisés pour le ciblage des DCs

i. DEC205

Le récepteur d'endocytose DEC205 (CD205 ou « lymphocyte antigen Ly 75 ») appartient à la famille des C-lectines de type I (Figdor et al., 2002). Il est constitué d'un domaine riche en cystéine et de 10 domaines de reconnaissance de motifs glucidiques (« carbohydrate domain recognition ») consécutifs dans la partie extracellulaire. Le récepteur DEC205 est capable de fixer des corps apoptotiques (Shrimpton et al., 2009). Son ciblage permet la présentation croisée de l'antigène. En effet, les cDC1 issues d'une souris DEC205^{-/-} préalablement immunisée par un anti-DEC205-OVA (ovalbumine) ne sont plus capables d'induire la prolifération des lymphocytes OT-I *in vivo* (lymphocytes T CD8⁺ transgéniques reconnaissant spécifiquement OVA) (Reuter et al., 2015).

Le profil d'expression de DEC205 sur les DCs diffère selon l'espèce. Il est exprimé de manière prédominante sur les cDC1 chez la souris (Diana Dudziak et al., 2007; Lahoud et al., 2012). Son expression n'est pas restreinte aux DCs. Il est également présent sur les cellules épithéliales thymiques, les lymphocytes T et les lymphocytes B chez la souris (Inaba et al., 1995; Witmer-Pack et al., 1995). Chez l'Homme, son expression est encore plus pléiotropique. DEC205 a été mise en évidence sur les lymphocytes T, les lymphocytes B les monocytes et les Natural Killer (NK) (Kato et al., 2006).

Les études pionnières démontrant l'efficacité du ciblage des DCs ont été réalisées chez la souris par l'utilisation d'un anticorps anti-DEC205. Quelle que soit la voie d'administration, l'injection d'un anti-DEC205 chez la souris était capable de fixer les DCs présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (Hawiger et al., 2001; Mahnke et al., 2003). L'injection d'un anti-DEC205 fusionné à l'OVA et d'un adjuvant (anti-CD40) par la voie sous-cutanée ou

intrapéritonéale induit une prolifération des OT-I et OT-II naïfs *in vivo*, la différenciation en lymphocytes T effecteurs aboutissant à une réponse cellulaire IFN γ robuste dans la rate et dans les ganglions par rapport à l'OVA non adressé (Bonifaz et al., 2002, 2004; D. Dudziak et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les peptides dérivés de l'OVA ont été présentés via le MHC I et II suite à l'endocytose, l'internalisation et la dégradation du complexe. Un autre paramètre important qui a été mis en évidence durant ces études est le rôle primordial de l'adjuvant dans l'induction d'une réponse effectrice dans le ciblage des DCs via DEC205. En effet, le ciblage des DCs en absence d'adjuvant induit une réponse tolérogène (Hawiger et al., 2001; Mahnke et al., 2016, 2003).

DEC205 fait partie des récepteurs les plus utilisés dans la stratégie de ciblage des DCs et a été testé dans plusieurs espèces. Différents types (protéiques, géniques) et différents formats (anticorps, fragment scFv) de vaccins ont été utilisés pour le ciblage de DEC205 avec des modes d'administrations, des doses et des adjuvants variés. La majorité des études ont montré son efficacité dans l'amélioration des réponses immunes contre divers pathogènes tels que le VIH (Nchinda et al., 2008; Ngu et al., 2017) ou le virus respiratoire syncytial (Hua et al., 2017) et le cancer (Demangel et al., 2005; Johnson et al., 2008). Des études ont montré l'amélioration des réponses cellulaires IFN γ et humorales contre le parasite *Anaplasma marginale* chez le veau (Njongmeta et al., 2012), et l'induction d'une meilleure réponse humorale contre la grippe chez le poulet (Jáuregui-zúñiga et al., 2017). Récemment, une étude clinique en phase I (NCT01834248) a montré à la fois l'induction d'une réponse humorale spécifique et cellulaire IFN γ chez des patients atteints de différents cancers après l'injection d'un anti-DEC205 fusionné à l'antigène NY-ESO-1 présent sur une majorité de cellules tumorales, en présence d'adjuvants (Dhodapkar et al., 2014). De manière intéressante, la stratégie de ciblage des DCs via DEC205 en absence d'adjuvant, est également une approche vaccinale prometteuse contre les maladies inflammatoires et auto-immunes. Des études ont montré l'augmentation des Tregs suite à l'injection d'un anti-DEC205 couplé à des auto-antigènes associée à un effet bénéfique vis-à-vis de maladies auto-immunes dans le modèle murin (Ring et al., 2017; Spiering et al., 2017).

ii. CD11c

Le récepteur CD11c fait partie de la famille des intégrines. Il est formé d'une chaîne α et β . Il interagit avec la molécule d'adhésion ICAM-1, des protéines de la matrice extracellulaire (fibrinogène, collagène) et la protéine du complément iC3b impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées (Sadhu et al., 2007). Il est exprimé sur un large spectre de cellules du système immunitaire, notamment sur les monocytes, les macrophages, les NKs chez l'Homme et la souris. Il est également exprimé sur les différentes sous-populations de DCs chez l'Homme, la souris et le mouton et est donc une cible attractive pour le ciblage des DCs (Kurts, 2008).

L'injection d'un anticorps anti-CD11c fusionné à l'OVA avec un adjuvant (anti-CD40) par la voie intraveineuse chez la souris induit une prolifération des OT-I et OT-II et une réponse cellulaire IFN γ supérieure par rapport à l'injection d'un anti-DEC205-OVA, un anti-MHC II-OVA ou un anti-CD40-OVA (Castro et al., 2008). Une autre étude a montré l'effet d'un anti-CD11c-OVA dans l'induction de la réponse humorale plus efficace par rapport aux autres candidats existants utilisés pour le ciblage des APCs (anti-DEC205, DCIR2, MHC II, CD40), et même en l'absence d'adjuvant (White et al., 2010). De manière intéressante, l'injection d'un anti-CD11c-OVA favorise la formation de centres germinatifs contrairement à l'OVA non adressé (White et al., 2010).

L'immunisation des souris par un vaccin à ADN codant pour un scFv anti-CD11c fusionné à un antigène tumoral (scFv CD11c-HER2) et administré par une électroporation (Wang et al., 2015) ou l'injection d'une protéine de fusion anti-CD11c-HER2 (Wei et al., 2009) en présence d'adjuvant induit une réponse cytotoxique anti-tumorale, améliore la survie et retarde significativement la croissance tumorale. Chez le porc, l'injection d'un anticorps anti-CD11c biotinylé couplé aux antigènes NP, M2e et HA2 du virus Influenza par voie intramusculaire avec l'adjuvant CpG, n'améliore pas la protection anti-grippale malgré l'augmentation de la réponse cellulaire IFN γ , en comparaison à l'injection des antigènes non ciblés (Bernelin-Cottet et al., 2016).

iii. CLEC9A

Aussi appelé DNGR-1, CLEC9A est un récepteur de la famille des C-lectines de type II, composé d'un seul domaine CRD extracellulaire. Il a un rôle essentiel dans la présentation croisée de corps apoptotiques par interaction avec les filaments d'actines (actine F) (Sancho et

al., 2009; Zelenay et al., 2012). Chez l'Homme, il est sélectivement exprimé sur les cDC1. Chez la souris, il est exprimé sur les cDC1 et les pDCs.

L'adressage d'un antigène au récepteur CLEC9A induit l'activation des lymphocytes T et une production d'anticorps avec et sans adjuvant. Plusieurs études ont montré que l'injection d'un anti-CLEC9A fusionné à l'OVA en absence d'adjuvant par voie intraveineuse conduit à une prolifération des OT-I et OT-II *in vivo* (Caminschi et al., 2008; Joffre et al., 2010; Lahoud et al., 2011). L'immunisation de souris avec un anti-CLEC9A-gag-p24 du VIH en présence d'adjuvant (anti-CD40) induit l'activation des lymphocytes T anti-gag-p24 CD8⁺ et CD4⁺ ayant un profil Th1 (Idoyaga et al., 2010). De plus, le profil des lymphocytes T CD4⁺ activés est modulable en fonction de l'adjuvant utilisé. L'immunisation d'une souris par un anti-CLEC9A-OVA avec le poly :IC induit une réponse de type Th1 tandis que l'injection d'un anti-CLEC9A-OVA avec le curdlan induit une réponse de type Th17 (Joffre et al., 2010).

Plusieurs études ont montré l'induction d'une réponse humorale robuste lorsque l'antigène est adressé vers CLEC9A dans le modèle murin et primate non humain, avec ou sans adjuvants (Caminschi et al., 2008; Joffre et al., 2010; Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011; Li et al., 2015; Park et al., 2013, 2017). Ces observations ont amenés les auteurs à investiguer les mécanismes impliqués. Les études ont rapporté la persistance de l'anti-CLEC9A dans le sang et sur les CD8 α^+ (cDC1) dans la rate de souris (détectable jusqu'à 4 jours) après son injection par voie intraveineuse (Lahoud et al., 2011). L'anti-CLEC9A induit le développement de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Tfh et une augmentation de lymphocytes B mémoires dans la rate au niveau des centres germinatifs *in vivo*, même en l'absence d'adjuvant (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011; Li et al., 2015).

L'ensemble des résultats suggèrent que le ciblage des DCs via CLEC9A permettrait une présentation antigénique prolongée des cDC1 aux lymphocytes T naïfs. La différenciation de ces derniers en Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires favoriserait le développement de centres germinatifs et donc l'induction d'une réponse humorale robuste.

iv. XCR1

XCR1 est le récepteur de la chimiokine XCL1 sécrétée par les NK et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés chez la souris. Chez l'Homme deux autres ligands ont été identifiés, appelés huXCL1 et huXCL2 (Yoshida et al., 1998). XCL1, sécrété par les lymphocytes T CD8⁺ activés, attire les cDC1, ce qui favorise le développement des CTLs (Dorner et al., 2009). XCR1 est le seul récepteur sélectivement exprimé de manière conservée sur les cDC1 de mammifères phylogénétiquement éloignés (Croizat et al., 2010b; Vu Manh et al., 2015). Il constitue donc un candidat idéal pour le ciblage sélectif des cDCs.

Chez la souris, l'injection de faibles doses anticorps anti-XCR1 fusionné à l'OVA ou le ligand XCL1 fusionné à l'OVA par voie intraveineuse avec du LPS induit une prolifération des OT-I et OT-II *in vivo* contrairement à l'injection d'OVA non ciblée chez la souris (Fossum et al., 2015). Dans cette même étude, le ciblage de l'OVA vers des DCs via XCR1 induit la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th1 et des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en CTL, conduisant à un effet anti-tumoral sur des tumeurs exprimant OVA.

L'induction d'une réponse immunitaire et protectrice a été observée dans des études utilisant des « vaccibodies » (cf partie D.3) dirigés contre le virus la grippe (Fossum et al., 2015) et contre des antigènes tumoraux chez la souris (Terhorst et al., 2015). L'immunisation des souris avec des plasmides codant pour des vaccibodies XCL1-HA par voie intradermique combinée à l'électroporation induit une augmentation de la réponse T cellulaire IFN γ et de la réponse humorale, et elle protège contre une infection expérimentale létale par le virus Influenza, par rapport à l'HA non adressée (Fossum et al., 2015). L'immunisation des souris avec une protéine XCL1-OVA par voie intradermique confère une meilleure réponse cellulaire IFN γ par rapport à l'immunisation avec l'OVA non adressée et protège contre la progression tumorale après l'injection d'un mélanome exprimant OVA (Terhorst et al., 2015).

b) Les critères clés déterminant la présentation antigénique suite au ciblage des DCs

Plusieurs études ont essayé d'étudier si l'efficacité de présentation antigénique pouvait être influencée par le routage intracellulaire entrepris par l'antigène suite à son adressage vers un récepteur d'endocytose particulier. Il a été généralement admis qu'une protéolyse limitée et

donc un adressage des antigènes vers des endosomes précoces était favorable à la présentation croisée (Cohn et al., 2013). A l'inverse, un adressage des antigènes vers des endosomes tardifs favorise la présentation par le MHC II. Cependant ce concept fait débat puisque DEC205, récepteur impliqué dans la présentation croisée des antigènes, les adresse vers les endosomes tardifs *in vitro* (Kastenmüller et al., 2014).

Une autre étude a montré que le niveau d'expression, le taux de recyclage, la capacité et la vitesse d'internalisation de différents récepteurs utilisés pour le ciblage des APCs, tels que l'anti-DEC205, l'anti-CLEC9A, l'anti-CD11c et l'anti-CD11b et l'anti-CD40, n'étaient pas des facteurs déterminant l'efficacité de présentation antigénique par le MHC I et II (Reuter et al., 2015). L'efficacité du ciblage résiderait dans une combinaison entre 1) les propriétés intrinsèques des sous-populations de DCs ciblées, 2) le type de récepteur ciblé et les caractéristiques de son routage intracellulaire et 3) l'activation de la DC, et possiblement du microenvironnement tissulaire.

4. Les outils pour le ciblage des DCs

Il existe différents formats utilisés dans les études de la stratégie de ciblage des DCs (Lehmann et al. 2016).

a) Les anticorps fusionnés aux antigènes

L'anticorps dirigé contre un récepteur spécifique à la surface des DCs directement fusionné à l'antigène d'intérêt via un espaceur (« linker ») produit par clonage moléculaire a été le plus utilisé dans l'approche de ciblage des DCs (Figure 12.A) (Lehmann et al. 2016). Il est également possible de coupler l'anticorps à l'antigène d'intérêt de manière non covalente via le système biotine-streptavidine (Bernelin-Cottet et al., 2016) ou de manière covalente par liaison chimique via un agent chimique de couplage (Hesse et al., 2013).

b) Les « single-chain fragment variable »

Les progrès dans l'ingénierie des anticorps ont permis l'explosion de nouvelles approches thérapeutiques en cancérologie. Les fragments scFvs (« single chain fragment variable ») correspondant aux régions variables lourdes et légères des anticorps sans la partie cristallisable (Fc) liée entre elles par un espaceur flexible et hydrophile sont produits par clonage moléculaire (Figure 12.B) (Lehmann et al. 2016). Cette forme de plus petite taille qu'un anticorps présente l'avantage d'être plus facilement produite et évite une interférence via la partie Fc avec d'autres cellules possédant le récepteur au Fc telles que les macrophages. En revanche, les scFvs ont une avidité plus faible par rapport aux anticorps complets car ils sont monomériques.

c) Les plateformes vaccinales ou « vaccibodies »

Plus récemment, des complexes protéiques appelées « vaccibodies » ont été développés par l'équipe de Bjarne Bogen. Ce complexe présente 3 modules : une unité servant au ciblage des DCs (ligand d'un récepteur ou scFv), un module de dimérisation et l'antigène d'intérêt (Gudjonsson et al., 2017; Terhorst et al., 2015). Cette molécule confère une meilleure avidité par rapport à un scFv (Figure 12.C).

d) Les liposomes et nanoparticules

D'autres approches prometteuses ont été développées pour améliorer la délivrance de l'antigène, notamment via des liposomes et des nanoparticules adressés vers les DCs (Figure 12.D et E). L'objectif est de délivrer de façon concomitante l'antigène et l'adjuvant à la même DC permettant une optimisation des réponses (Schlosser et al., 2008). L'adressage est assuré par des scFvs (Van Broekhoven et al., 2004), des anticorps (Cruz et al., 2014) ou des ligands (glycoconjugués, Cruz et al., 2012) fixant des récepteurs à la surface des DCs, et liés de façon covalentes à la surface de nanoparticule ou de liposome contenant un antigène et un adjuvant.

Une étude a montré que des liposomes décorés de molécules scFvs dirigées contre des récepteurs des DCs et transportant l'antigène (OVA) et l'adjuvant (LPS) induisaient des CTLs présentant une activité cytotoxique chez la souris (Van Broekhoven et al., 2004). L'injection de nanoparticules biodégradables (PLGA) présentant à leur surface des anticorps dirigés contre des récepteurs de surface des DCs dans lesquelles sont encapsulés l'antigène et l'adjuvant améliore la réponse cellulaire T CD8⁺ par rapport à des nanoparticules non adressées vers les DCs chez la souris (Cruz et al., 2014).

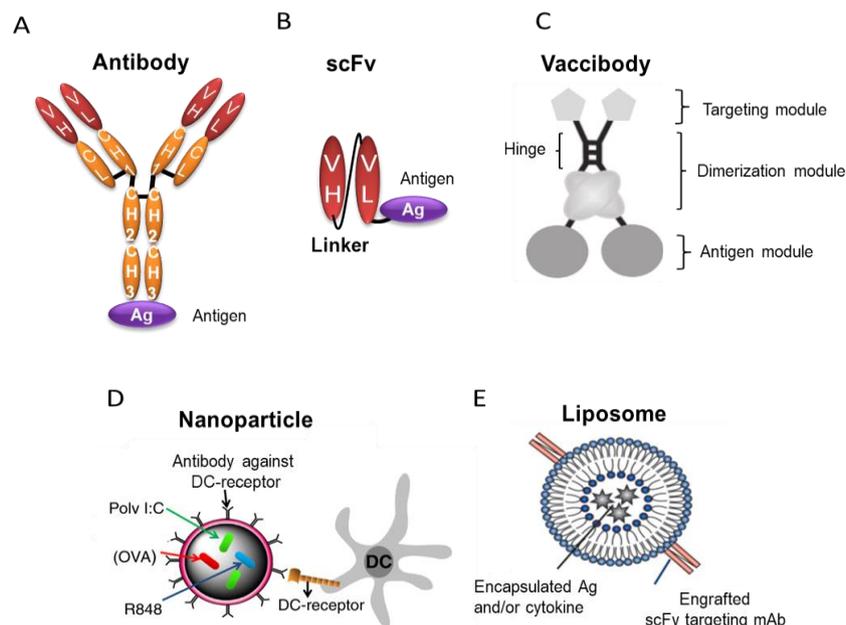


Figure 12: Les différents formats utilisés pour le ciblage des DCs *in vivo*

A. Il existe plusieurs formats anticorps anti-récepteur de DC-antigène : l'anticorps dirigé contre un récepteur à la surface des DCs donné est lié avec l'antigène d'intérêt par un espaceur produit par clonage moléculaire, par couplage chimique ou par couplage non covalent.

B. Les scFv (« single chain fragment variables ») sont constitués des domaines VH et VL d'un anticorps spécifique d'un récepteur à la surface des DCs liés entre eux par un espaceur. L'antigène vaccinal est lié au scFv par un second espaceur. **C.** Les plateformes vaccinales protéiques (« vaccibody ») sont constituées d'une unité de ciblage (ex : scFv ou ligand d'un récepteur de DC) lié avec les antigènes par l'intermédiaire d'un domaine de dimérisation (ex : région charnière d'un anticorps + région CH3 d'un anticorps IgG γ 3 humain).

D et E. Les nanoparticules (<100nm) biodégradables (ex : PLGA) ou les liposomes renferment l'antigène (ex : OVA) avec un ou plusieurs adjuvants (ex : poly :IC et R848). Des ligands spécifiques (glycoconjugués) de récepteurs de DCs, des anticorps ou des scFv spécifiques contre un récepteur à la surface des DCs sont greffés. *Adaptée d'après Irina Caminschi et al, Frontiers in Immunology, 2012 ; Even Fossum et al, European Journal of Immunology, 2012 ; L.Cruzt et al, Journal of Controlled Release, 2014.*

D. La vaccination à ADN

La vaccination à ADN consiste à transférer les cellules de l'hôte *in vivo* par un plasmide codant un antigène vaccinal d'intérêt ou une molécule à visée thérapeutique, dans le but de générer une réponse immunitaire et protectrice. Cette stratégie vaccinale est prometteuse contre des maladies infectieuses en santé humaine ou vétérinaire grâce aux avantages qu'elle possède. En effet, le plasmide est stable, sûr, sa synthèse est rapide à grande échelle et leur production présente un coût abordable. Ces critères sont avantageux pour la constitution de réserves mondiales de vaccins dont l'utilisation est réservée en situation d'émergence d'épidémies. Toutefois l'obstacle majeur est l'induction d'une réponse immunitaire effective. Nous verrons dans cette partie les différents moyens employés (les méthodes de transfection, les adjuvants, la stratégie de ciblage des DCs) pour améliorer l'immunogénicité de la vaccination à ADN.

1. Contexte général sur la vaccination à ADN

a) Historique

Les études pionnières en génie génétique ont montré que l'injection d'un plasmide codant une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur pouvait conduire à la synthèse de la protéine *in vivo* chez la souris (Dubensky et al., 1984; Wolff et al., 1990) et dans un modèle de primate non humain (Hans Will, Roberto Cattaneo, Hans-Georg Koch, Gholamreza Darai, 1982). Ces résultats ont permis l'émergence de la vaccination contre les maladies infectieuses. La preuve de concept a été montrée par l'équipe de Stephen A. Johnston après une immunisation de souris par biolistique (ou « gene gun ») de plasmides codant l'hormone de croissance humaine (hGH) adsorbés sur des particules d'or (De-chu Tang, Michael DeVit, 1992). Plusieurs vaccins à ADN contre des maladies infectieuses ont été développés par la suite et ont conduit à des résultats encourageants chez la souris (Khan 2013).

b) L'expression du plasmide et son immunogénicité

Le mécanisme d'entrée dans la cellule diffère selon les voies d'administration et la méthode de transfection d'ADN. Une fois dans le milieu intracellulaire, le plasmide doit franchir plusieurs obstacles pour pouvoir être exprimé, notamment éviter la fragmentation par les nucléases présents dans le cytosol et traverser les membranes dont celle du noyau cellulaire. En effet une étude a estimé que moins de 0.1% de la quantité initiale du plasmide entre dans le noyau. Son entrée s'effectue via les pores nucléaires ou durant une brèche créée lors de la division cellulaire (Tregoning and Kinnear, 2014). Le plasmide ne se réplique pas et se maintient dans le noyau sous la forme d'un épisome. Il est transcrit en ARNm puis traduit dans le cytosol par la machinerie cellulaire de la cellule hôte.

L'acheminement du plasmide vers le noyau cellulaire conduit à l'activation du complexe pro-inflammatoire Aim2-inflammasome, et des voies de signalisations STING-TBK1-IRF3, impliquées dans l'immunogénicité des vaccins à ADN. En effet, les souris présentant une invalidation de gènes codant pour Aim2, STING et TBK1 ont un défaut dans la sécrétion des cytokines de l'immunité innée (IFN de type I, TNF- α), et dans la mise en place d'une réponse cellulaire et humorale spécifique suite à une immunisation par un plasmide (Ishii et al., 2008; Ishikawa, 2015; Suschak et al., 2016, 2015).

Plusieurs voies d'apprêtement et de présentation antigénique sont envisageables selon les types de cellules transfectées. Dans le cas des cellules somatiques transfectées, les peptides dérivés des antigènes sécrétés dans le milieu extracellulaire, libérés lors de l'apoptose de la cellule ou issus de la phagocytose des cellules transfectées sont internalisés par les APCs qui les présentent par le MHC I (présentation croisée) aux lymphocytes T CD8⁺ et par le MHC II aux lymphocytes T CD4⁺. Dans le cas des APCs transfectées directement, les antigènes synthétisés dans le cytosol sont apprêtés et présentés via le MHC I aux lymphocytes T CD8⁺ (Tregoning and Kinnear 2014).

c) Les succès et les échecs de la vaccination à ADN

Les premiers essais de vaccination à ADN ont montré l'efficacité d'un plasmide pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice chez la souris. L'injection intramusculaire d'un plasmide codant l'hémagglutinine du virus Influenza a induit une réponse cellulaire cytotoxique, une réponse humorale et a conféré une protection lors d'une infection

expérimentale létale par rapport aux souris non vaccinées (Fynan et al., 1993). Une autre étude a également mis en évidence l'induction d'une réponse CTL robuste suite à l'injection d'un plasmide codant la nucléoprotéine du virus Influenza et la protection contre une infection par une souche hétérologue du virus de la grippe (Ulmer et al., 1993). Ces résultats prometteurs ont conduit au développement exponentiel de vaccins à ADN contre divers pathogènes chez la souris tels que la malaria, le VIH et la tuberculose (Khan 2013).

La majorité des études a montré que l'immunogénicité induite demeure modeste. A ce jour, aucun vaccin à ADN n'a été enregistré pour l'Homme (Tregoning and Kinnear 2014). Outre les différences d'efficacité de transfection et d'expression *in vivo* qu'il peut y avoir entre les hôtes suite à l'inoculation de l'ADN, un paramètre pouvant expliquer ces différences d'efficacités entre les rongeurs et les grands mammifères est la quantité de plasmide injectée. En effet, chez la souris, les immunisations sont réalisées avec des quantités de plasmide qui varie entre 50µg-200µg. Tandis que chez l'Homme, la quantité varie entre 2mg-8mg. Or, il faudrait injecter l'équivalent d'environ 0.5g de plasmide, en prenant comme poids moyen : 20g pour une souris, 63kg pour une femme et 77kg pour un homme. Néanmoins, 3 vaccins à ADN à usage vétérinaire ont été commercialisés en 2005 contre le virus du West Nile chez les chevaux, en 2010 contre la nécrose pancréatique infectieuse chez le saumon et pour traiter le mélanome du chien (M. A. Liu 2011).

2. Les méthodes de transfection *in vivo*

Un paramètre clé en vaccination à ADN est l'expression de l'antigène. Il existe différentes méthodes de délivrance pour optimiser la transfection des cellules de l'hôte et par conséquent son expression.

a) Les formulations

Les liposomes et les polymères cationiques sont les deux types de formulation les plus utilisés qui permettent de stabiliser l'ADN dans le milieu extracellulaire et de véhiculer efficacement l'ADN vers les compartiments endosomaux (Tregoning and Kinnear 2014). Le liposome cationique constitué d'une bicouche lipidique, adsorbe l'ADN et forme un complexe capable de fusionner avec la membrane cellulaire permettant ainsi l'entrée de l'ADN dans les cellules. Les polymères cationiques tels que la polyéthylèneimine (PEI) ou les nanoparticules poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) rendues cationiques par couplage avec du CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), s'associent à l'ADN grâce aux interactions électrostatiques et aboutissent à la formation d'un complexe qui entre dans la cellule par endocytose. Les formulations induisent une immunogénicité finalement modérée (Ramamoorth and Narvekar, 2015).

b) Tatouage

La délivrance de l'ADN par la technique du tatouage consiste à injecter le plasmide par voie cutanée à l'aide d'aiguilles oscillant à une haute fréquence et perçant à plusieurs reprises la peau. Cette méthode nécessite de délivrer le plasmide sur une très grande surface, et le taux de transfection des cellules semble faible (van den Berg et al., 2009). Des études ont montré l'induction d'une réponse immunitaire chez la souris (Pokorna et al., 2008) mais les résultats sont plutôt mitigés chez le primate non humain (Grunwald et al., 2014; Verstrepen et al., 2008).

c) Gene gun

Cette méthode consiste à transférer les cellules par propulsion de billes microscopiques (particules d'or dans la plupart des cas) sur lesquelles est adsorbé l'ADN (Tregoning and Kinnear 2014). Elle présente l'avantage de requérir une quantité faible de plasmide (Tregoning and Kinnear 2014) et induit une réponse humorale et cellulaire dans différentes espèces dont les primates non humains (Fuller et al., 2006).

d) Injection sous pression sans aiguille ou « needle-free jet injector »

La vaccination par pression est une méthode de délivrance sans aiguille qui consiste à injecter un liquide sous haute pression à l'aide d'un ressort ou d'un gaz à haute pression comprimé au travers d'un petit orifice de 0.1 à 0.5mm dans la peau ou le muscle. Récemment, une étude a mis en évidence l'induction d'une réponse humorale robuste après inoculation du virus de la grippe inactivé par le dispositif «jet injector» chez l'Homme (McAllister et al., 2014), et a été approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) pour la vaccination contre le virus de la grippe (<https://pharmajet.com/fda-approves-afluria-influenza-vaccine-pharmajets-needle-free-injector/>). En vaccination à ADN, des études ont montré l'induction efficace d'une réponse humorale chez le porc contre la grippe (Grodeland et al., 2016) et est actuellement en phase I d'étude clinique contre le virus Zika (NCT02996461). Cette méthode de vaccination peut cependant générer des douleurs et des réactions locales plus intenses qu'une injection par une aiguille (McAllister et al. 2014).

e) Electroporation

L'électroporation (EP) est une méthode de transfection qui consiste à appliquer un champ électrique à la surface de la peau ou dans le muscle grâce à des électrodes adaptées après l'injection du plasmide nu. Le mécanisme de transfection de l'ADN dans les cellules n'a pas été clairement défini, mais l'impulsion électrique générée par l'électroporateur induirait une instabilité temporaire de la membrane cellulaire qui conduirait à la formation de pore permettant ainsi l'entrée du plasmide dans les cellules (Rols et al., 2002; Tregoning and Kinnear, 2014). Bien que plusieurs paramètres différents ont été utilisés (le nombre de répétitions et la durée de l'impulsion, l'intervalle de temps entre chaque impulsion et le

voltage appliqué) et la plupart des études ont montré que l'EP augmente significativement l'expression du transgène *in vivo* (Roos et al., 2009; Todorova et al., 2017; Wang et al., 2014), et améliore l'immunogénicité chez la souris (Mann et al., 2014; Widera et al., 2000) et le primate non humain (Martinon et al., 2009). Chez l'Homme, l'EP associée à un vaccin à ADN anti-VIH en phase d'étude clinique améliore son immunogénicité (Vasan et al., 2011). Indépendamment de la présence d'ADN, l'EP de surface chez le primate non humain induit une infiltration de lymphocytes T, de DCs, de macrophages, de granulocytes et la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-12, favorable à la mise en place de la réponse adaptative (Todorova et al. 2017). Ainsi l'EP a un effet adjuvant.

3. Les adjuvants géniques

Dans le contexte de la vaccination à ADN, les adjuvants tels que le GM-CSF, l'IL-2, l'IFN γ , l'IL-12 et l'IL-15 peuvent être utilisés sous forme génique (Saade and Petrovsky 2012). Le GM-CSF a un rôle pléiotropique dans le système immunitaire incluant l'activation des lymphocytes T, l'induction de lymphocyte T CD8⁺ mémoires, le recrutement d'APCs (Kaufman et al., 2014). Chez l'Homme, cette cytokine a été utilisée dans de nombreux essais cliniques réalisés chez des patients atteints de mélanome à un stade avancé. Les études ont montré qu'elle pouvait améliorer la réponse anti-tumorale et la survie (Kaufman et al., 2014). De plus, de nombreuses études ont rapporté l'amélioration de l'immunogénicité de la vaccination à ADN en présence d'un plasmide codant le GM-CSF dans le modèle murin et primate non humain (Saade and Petrovsky 2012). Un essai clinique en phase I/II a évalué l'utilisation d'un plasmide codant le GM-CSF chez des patients atteints de mélanome à un stade avancé, et a montré une réponse cellulaire améliorée (Perales et al., 2014). Enfin chez le mouton, de bonnes réponses humorales ont été obtenues avec l'utilisation du GM-CSF sous sa forme génique en vaccination à ADN contre le virus de la fièvre aphteuse (Niborski et al., 2006).

4. Le ciblage des DCs par vaccination à ADN

Le potentiel de la vaccination à ADN peut être amélioré par le ciblage des antigènes vers les DCs. En effet, l'immunisation par un plasmide codant pour un scFv dirigé contre DEC205

fusionné à l'OVA administré par EP chez la souris induit une prolifération des lymphocytes T OT-I et OT-II *in vivo*, et améliore la production spécifique d'anticorps anti-OVA (Nchinda et al., 2008). L'amélioration des réponses cellulaires et humorales a été confirmée dans d'autres études chez la souris par l'utilisation de plasmides codant pour 1) un scFv DEC205 fusionné à l'antigène gp41 du VIH (Nchinda et al., 2008) ou fusionné à l'antigène tumoral (Cao et al., 2013), 2) pour un scFv CD11c fusionné à l'antigène tumoral (Wang et al., 2015), 3) pour un «vaccibody» ciblant un antigène tumoral au complexe MHC II (Fredriksen et al., 2006) ou un vaccibody ciblant l'hémagglutinine du virus de la grippe à XCR1 (Gudjonsson et al., 2017) ou MHC II (Grodeland et al., 2016). Cette stratégie a été testée dans des modèles non murins. L'immunisation avec un plasmide codant pour un scFv ciblant le récepteur DEC205 chez le veau fusionné à un antigène MSP1a du parasite *Rickettsia Anaplasma marginale* améliore la réponse cellulaire IFN γ par rapport à un plasmide codant un scFv irrelevant fusionné à MSP1a (Njongmeta et al., 2012). Cependant, d'autres études ont montré que le ciblage des DCs en vaccination à ADN n'améliorait pas l'immunogénicité et induisait une réponse tolérogène même en présence d'adjuvant génique (Niezold et al., 2015; Tenbusch et al., 2012). En effet, chez le primate non humain, l'immunisation par un plasmide codant un scFv DEC205 fusionné à l'antigène p27 du SIV n'améliore pas l'immunogénicité du vaccin (Tenbusch et al., 2012). L'administration d'un plasmide codant pour un scFv DEC205-HA par voie intramusculaire avec EP a conduit à une induction de Tregs dans les ganglions de souris immunisées et à une réduction des réponses cellulaires par rapport à celles induites par un plasmide codant l'HA non ciblé (Niezold et al., 2015). De plus, la co-injection d'un adjuvant génique codant l'IL-12 n'améliore pas l'immunogénicité. Le mécanisme expliquant les différences d'immunités induites par les vaccins à ADN codant les antigènes ciblés vers DEC205 n'a pas été étudié.